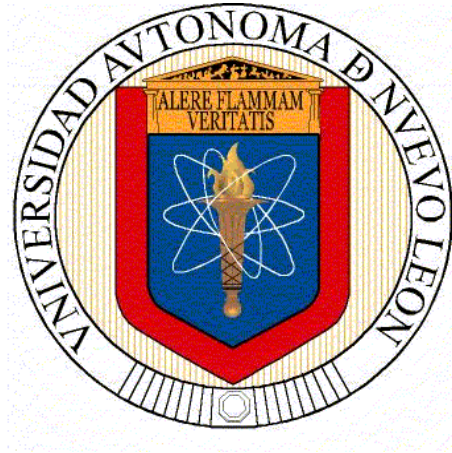


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**EVALUACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL Y POTENCIALES
VIAS DE SEÑALIZACIÓN NEURONAL AFECTADAS TRAS LA
INHIBICIÓN DEL GEN *PRR12* POR ARNi**

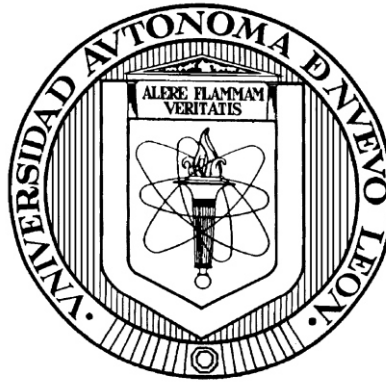
POR:

ALEJANDRO GARCÍA RUÍZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

JULIO 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**EVALUACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL Y POTENCIALES
VIAS DE SEÑALIZACION NEURONAL AFECTADAS TRAS LA
INHIBICIÓN DEL GEN *PRR12* POR ARNi**

POR:

Q.F.B. ALEJANDRO GARCÍA RUÍZ

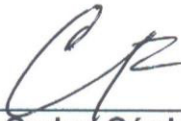
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**

ASESOR: DR. CARLOS CÓRDOVA FLETES

JULIO 2015

**EVALUACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL Y POTENCIALES VÍAS
DE SEÑALIZACIÓN NEURONAL AFECTADAS TRAS LA INHIBICIÓN DEL
GEN *PRR12* POR ARNi.**

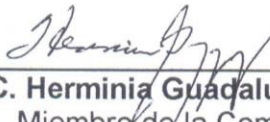
Aprobación de la tesis:



Dr. en C. Carlos Córdova Fletes
Director de Tesis



Dr. en C. Román Vidal Tamayo Ramírez
Co-Director de Tesis



Dra. en C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa, Irma, por estar siempre conmigo, en los buenos y malos momentos, prestándome apoyo cuando se necesita, por animarme a comenzar esta maestría y aguantar la vida con un esposo-padre-estudiante-becario de CONACYT.

A mis hijos, Andrea y Román, que no importa la situación, están siempre presentes, animando a su padre, logrando sonrisas aun en los peores momentos, brindando su amor incondicional.

A mis padres y mi familia, quienes de una forma u otra siempre brindan su apoyo cuando se necesita, siempre atentos a los avances y a los retrocesos de todo este proceso.

A mi asesor, el Dr. Carlos, por aceptarme como su alumno, y permitirme aprender grandes cosas de él, por confiar en mí, a pesar de las veces que las cosas salían mal, y por permitirme continuar por el camino de la investigación.

A mi comisión de tesis y colaboradores, el Dr. Román, la Dra. Herminia, Dra. Ilse, Dra. Ana y Dra. Viviana quienes me brindaron su tiempo, sus consejos y su conocimiento, siendo de gran apoyo para este proyecto y para el cumplimiento de mi maestría.

A mis compañeros, que aunque seamos de distintos departamentos o laboratorios, seguimos apoyándonos y brindándonos ánimos como un equipo.

Al equipo infecto de la Dra. Ana, a Elsa y Alex quienes tomaron de su tiempo para enseñarme lo que yo no sabía, y apoyarme en la realización de mis experimentos.

A la UANL y CONACYT, grandes instituciones, sin las cuales esto no habría sido posible.

COLABORACIONES

Dra. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Laboratorio de Biología Estructural

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Dra. Ilse Delint Ramírez

Departamento de Farmacología y Toxicología

Dra. Ana María Guadalupe Rivas Estilla

Laboratorio de Infectología Molecular

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
RESUMEN	5
Capítulo I. Introducción	6
1.1 Subtipos celulares del SN.	7
1.2 Sinapsis.	8
1.3 Neurodesarrollo.	10
1.4 Discapacidad intelectual.	12
1.5 Translocaciones equilibradas.	18
Capítulo II. Antecedentes	22
2.1 Antecedentes directos.	22
2.2 Proline rich 12.	23
Capítulo III. Justificación	25
Capítulo IV. Hipótesis	26
Capítulo V. Objetivos	27
5.1 Objetivo general.	27
5.2 Objetivos específicos.	27
Capítulo VI. Materiales y Equipos	28
6.1 Materiales.	28
6.1.1 Materiales de uso general.	28
6.1.2 Material para cultivo celular.	29
6.1.3 Material para qPCR.	30
6.1.4 Microarreglo.	30
6.2 Equipos.	30
6.2.1 Equipos de uso general.	30
6.2.2 Equipo para cultivo celular.	30
6.2.3 Manejo de ácidos nucleicos.	31
Capítulo VII. Metodología	32
7.1 Tipo de estudio.	32
7.2 Estrategia general.	32
7.3 Obtención de cerebros.	33
7.4 Obtención y cuantificación de proteínas totales.	35
7.5 Western blot.	39
7.6 Inhibición de <i>PRR12</i> en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.	43

7.7 Extracción de ARN.	45
7.8 Retrotranscripción.	46
7.9 PCR punto final.	47
7.10 PCR tiempo real.	49
7.11 Microarreglo de expresión.	52
Capítulo VIII. Resultados	56
8.1 Obtención de cerebros.	56
8.2 Obtención y cuantificación de proteínas totales.	56
8.3 Western blot.	60
8.4 PCR tiempo real.	63
8.5 Inhibición de PRR12 en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.	69
8.6 Microarreglo de expresión.	72
Capítulo IX. Discusión	78
Capítulo X. Conclusiones	91
Capítulo XI. Perspectivas	93
Capítulo XII. Referencias	94
Capítulo XIII. Anexos	102
13.1 Anexo I. Condiciones de cultivo celular de la línea C6.	102
13.2 Anexo II. Lipotransfección reversa.	106
13.3 Anexo III. Extracción de ARN.	108
13.4 Anexo IV. Retrotranscripción.	110
13.5 Anexo V. Microarreglo de expresión de dos colores.	111
13.7 Anexo VI. Procesos biológicos afectados.	117
13.8 Anexo VII. Vías de señalización afectadas.	121
13.9 Anexo VIII. Esquemas de vías de señalización afectadas.	122

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius.
µg	Microgramos.
µL	Microlitros.
µM	Micromolar.
aa	Aminoácido.
ADN	Acido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNc	Ácido ribonucleico complementario.
ARNdc	Ácido ribonucleico de doble cadena.
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
Cel	Células.
CI	Coeficiente intelectual.
Ct	Umbral de cuantificación.
Ctrl	Control.
Cy3	Cyanine-3.
Cy5	Cyanine-5.
DI	Discapacidad intelectual.
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados.
E14	Embrión 14 días.
E15	Embrión 15 días.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
GO	GeneOntology.
h	Horas.
HCl	Ácido clorhídrico.
Kb	Kilobases.
kDa	Kilodaltones.
MgCl ₂	Cloruro de magnesio.
min	Minutos.
NaCl	Cloruro de sodio.
ng	Nanogramos.
nM	Nanomolar.
NPC	Células precursoras neuronales.
NTP's	Nucleótidos trifosfatados
P.F	Primer forward.

P.R	Primer reverse.
Pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PCR PF	Reacción en cadena de la polimerasa punto final.
pH	Potencial de hidrogeno.
PRR12	Proline rich 12.
PSD	Densidad post-sináptica.
PSP	Proteoma post-sináptico.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
RCBAE	Rearreglos cromosómicos equilibrados asociados a enfermedad.
RISC	Complejo silenciador inducido por ácido ribonucleico.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT	Retrotranscripción.
s	Segundos.
SDS	Duodecil sulfato de sodio.
SN	Sistema nervioso.
SNC	Sistema nervioso central.
SNP	Sistema nervioso periférico.
Taq	Termophilus acuaticus.
TBE	Tris-ácido bórico-ácido etilendiaminotetraacético.
TBS	Buffer tris-solución salina.
V	Volts.
xg	Gravedades.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PAGINA
1	Procesamiento de información presináptica.	9
2	Línea de tiempo de desarrollo del neocórtex de ratón.	11
3	Representación de PRR12.	24
4	Diagrama de estrategia general.	32
5	Rata hembra utilizada para el estudio.	33
6	Morfología de la línea celular C6 de glioblastoma de rata.	36
7	Diagrama de la hibridación de las muestras en el microarreglo.	53
8	Ejemplo de placa de 96 pozos para cuantificación de proteínas.	57
9	Curva de calibración, para muestras de la línea celular C6.	57
10	Curva de calibración, para cerebros de rata embrión y adulta.	58
11	Curva de calibración, para cerebros de rata neonata.	59
12	Western blot de la línea celular C6 de glioblastoma de rata.	60
13	Western blot de las muestras de cerebro de rata.	61
14	Comparación de la densitometría de los cerebros de rata.	62
15	PCR punto final.	63
16	Curva estándar de concentraciones de ADNc para <i>PRR12</i> .	64
17	Curva estándar de concentraciones de ADNc para <i>GAPDH</i> .	65
18	Curva de fusión de <i>PRR12</i> .	66
19	Expresión diferencial de <i>PRR12</i> en las muestras de cerebro.	67
20	Expresión diferencial de <i>GAPDH</i> en las muestras de cerebro.	67
21	Comparación de la expresión de ARNm de los cerebros de rata.	68
22	Expresión diferencial de las células C6 de glioblastoma de rata (24h).	69
23	Expresión diferencial de las células C6 de glioblastoma de rata (48h).	70
24	Inhibición de la expresión del ARNm de <i>PRR12</i> .	70
25	Evaluación de los cambios morfológicos de la línea celular C6.	71
26	Imagen del microarreglo posterior a la hibridación de las muestras.	72
27	Mapa de calor.	74
28	Receptores tipo rodopsina acoplados a proteína G (Parte 1).	122
29	Receptores tipo rodopsina acoplados a proteína G (Parte 2).	123
30	Receptores tipo rodopsina acoplados a proteína G (Parte 3).	124
31	Receptores tipo monoamínicos acoplados a proteína G.	125
32	Receptores tipo pequeños ligandos acoplados a proteína G.	126
33	Receptores tipo peptídicos acoplados a proteína G.	127
34	Vía de daño a medula espinal.	128

LISTA DE TABLAS

TABLA	CONTENIDO	PAGINA
1	Genes de DI, detectados a través de una translocación equilibrada.	19
2	Secuencias de los ARNi, contra los exones 5,6 y 14 de <i>PRR12</i> .	43
3	Concentraciones de reactivos que se utilizaron para la PCR PF.	48
4	Pasos de temperatura para PCR PF.	48
5	Concentraciones de reactivos que se utilizaron para la qPCR.	50
6	Pasos de temperatura utilizados para la qPCR.	50
7	Concentraciones de reactivos utilizados para la qPCR (cerebros).	51
8	Concentraciones de reactivos utilizados para la qPCR (células).	52
9	Procesos biológicos afectados tras la inhibición de <i>PRR12</i> .	75
10	Vías de señalización afectadas tras la inhibición de <i>PRR12</i> .	76
11	Genes desregulados en las células inhibidas y en paciente.	77
12	Marcadores gliales diferencialmente expresados.	84
13	Marcadores neuronales diferencialmente expresados.	85
14	Componentes de mix T7.	111
15	Componentes retrotranscripción para ADNc.	112
16	Componentes retrotranscripción para ARNc.	113
17	Mix para hibridación en el microarreglo.	115
18	Procesos biológicos afectados, con significancia estadística.	117
19	Vías de señalización afectadas, con significancia estadística.	121

RESUMEN

EVALUACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL Y POTENCIALES VIAS DE SEÑALIZACION NEURONAL AFECTADAS TRAS LA INHIBICIÓN DEL GEN *PRR12* POR ARNi

Nombre: Q.F.B. Alejandro García Ruíz.
Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León.
Localización: Monterrey, Nuevo León, México.
Fecha de titulación: Julio 2015.
Páginas del estudio: 113

Introducción: El sistema nervioso tiene como función el controlar y regular el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas de los vertebrados, coordinando su interrelación, así como la relación del organismo con el medio externo, permitiendo su interacción. Este sistema se comienza a desarrollar durante la etapa embrionaria mediante la neurogénesis, en la cual múltiples procesos biológicos trabajan en conjunto para asegurar que los diversos tipos de células nerviosas proliferen, se diferencien, migren y formen sinapsis en el momento y lugar apropiado, siendo un mecanismo finamente regulado, dependiente de la apropiada expresión temporal y espacial, así como del correcto funcionamiento de diferentes productos génicos. Debido a esto, mutaciones que alteren la correcta expresión o función de un gen involucrado en la neurogénesis y/o en el mantenimiento del SNC pueden contribuir a la iniciación y/o progresión de diversos desórdenes neurológicos.

En este respecto, nuestro grupo de investigación identificó por primera vez la ruptura del gen *PRR12*, en una paciente con discapacidad intelectual, alteraciones neuropsiquiátricas y múltiples malformaciones menores. Debido a esto, y a las características de la proteína *PRR12*, con una función hasta la fecha totalmente desconocida, este es un blanco deseable para el análisis de las vías de señalización en las que participa.

Objetivo: Describir los genes que son potencialmente regulados por *PRR12* y, a partir de ello, analizar las posibles vías y procesos de comunicación neuronal afectados tras su inhibición.

Materiales y Métodos: Se realizó una cuantificación relativa de la expresión de *PRR12* en cerebro de rata en diferentes estadios del desarrollo (embrión, neonatal y adulto), mediante Western blot y qPCR. Posteriormente se realizó la inhibición de *PRR12* en células C6 de glioblastoma de rata, mediante ARNi, con el fin de determinar los cambios en el perfil de expresión celular, mediante microarreglos de expresión.

Resultados: *PRR12* se encontró mayormente expresado en cerebro durante la etapa de embrión; además de esto, se encontraron afectados múltiples genes tras su inhibición, entre los que destacan aquellos involucrados en procesos biológicos relacionados a comunicación celular y de las vías de señalización de receptores de membrana acoplados a proteína G.

Conclusiones: *PRR12* es probablemente un factor de transcripción de remodelación de la cromatina, con posible implicación en el proceso de neurogénesis, especialmente en procesos de comunicación y diferenciación celular.

FIRMA DEL ASESOR:

Dr. Carlos Córdova Fletes

Capítulo I

Introducción

El sistema nervioso (SN) es una compleja red biológica de estructuras especializadas, que tiene como función el controlar y regular el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas de los vertebrados (Moreno, 2009), coordinando su interrelación, así como la relación de los seres con el medio externo. Esto a su vez permite la interacción de los organismos con el entorno; en particular, el SN juega un rol importante en prácticamente todos los aspectos de los seres humanos, tales como la percepción de sensaciones, emociones, memoria, movimiento, respiración y control de temperatura corporal (NICHD, 2014).

El SN se divide en dos grandes subsistemas (Moreno, 2009; NICHD, 2014):

- Sistema nervioso central (SNC): el cual se compone por el encéfalo y la médula espinal, y se encarga de recibir, integrar y correlacionar los distintos tipos de información sensorial, pensamientos, emociones y recuerdos.
- Sistema nervioso periférico (SNP): se compone de múltiples fibras nerviosas, las cuales se extienden fuera del SNC por la médula espinal, hacia los órganos y sistemas del cuerpo, y su función principal es la de conectar éstos con el SNC.

Como parte del SNC, el cerebro, forma la mayor parte del encéfalo y se encuentra localizado en la cavidad craneal. El cerebro consta de la corteza cerebral, la sustancia blanca y los núcleos estriados, siendo un sistema biológico altamente complejo, compuesto de diversas regiones funcionales, circuitos nerviosos y tipos celulares (Tebbenkamp et al., 2012). Se considera que el cerebro controla cada aspecto del ser humano y que es la estructura orgánica más compleja conocida hasta el momento (SfN, 2015).

1.1 Subtipos celulares del SN

Entre los tipos de células que conforman el cerebro y el sistema nervioso, se encuentran en primer lugar las neuronas, las cuales son la unidad básica funcional y estructural de todo el sistema nervioso. Las neuronas son células excitables que conducen los impulsos electro-químicos que hacen posibles todas las funciones del sistema nervioso, comunicándose entre sí mediante la sinapsis de axones y dendritas, a través de potenciales de acción que liberan estímulos químicos (neurotransmisores) (NICHD, 2014; Tebbenkamp et al., 2012) en las neuronas pre-sinápticas, los cuales son captados mediante receptores de membrana en la neurona post-sináptica, precediendo a analizar la información y enviarla a la siguiente neurona.

El segundo tipo celular que compone el sistema nervioso es la neuroglia, la cual consiste en diferentes linajes celulares, tales como astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias, células de Schwann y células satélites. En conjunto, estos tipos celulares son auxiliares de las neuronas y cumplen múltiples funciones, como el mantenimiento, sostén, nutrimento, eliminación de desechos y mielinización de las neuronas, además de su papel como células progenitoras neurales (Dimou et al., 2014), controlando así el microambiente neuronal.

1.2 Sinapsis

Para realizar su función, las neuronas se comunican mediante la sinapsis, la cual es la base de toda comunicación nerviosa, así como de la actividad cognitiva en el cerebro. Estos procesos se realizan mediante la utilización de señales químicas o neurotransmisores (Laumonnier et al., 2007), requiriendo un gran número de proteínas diversas, entre las cuales, se encuentran aquellas conservadas en el proteoma post-sináptico (PSP, del inglés post-synaptic proteome). El PSP consta de más de 1,180 proteínas distintas (Laumonnier et al., 2007), de las cuales, una gran parte se encuentran formando una estructura proteica denominada densidad post-sináptica (PSD, del inglés post-synaptic density), conformada por alrededor de 1,124 proteínas diferentes, aunque recientemente se han descrito alrededor de 1,461 proteínas (Bayés et al., 2012). Específicamente, la PSD es un gran complejo de proteínas, encontrado

justo debajo de la membrana post-sináptica de las neuronas, que cuenta con la función de detectar y responder al estímulo de neurotransmisores liberados en las terminales pre-sinápticas (Bar-shira et al., 2013) y captados por los diferentes tipos de receptores ionotrópicos y metabotrópicos, lo que activa una cascada de señalización donde la información pre-sináptica entra en la maquinaria de señalización post-sináptica. Enseguida, las señales pasan a un módulo de procesamiento de la información y se distribuyen hacia una red de mecanismos efectores que incluyen síntesis de proteínas específicas, apoptosis, reordenamiento citoesquelético y tráfico vesicular (Laumonnier et al., 2007) (Figura 1).

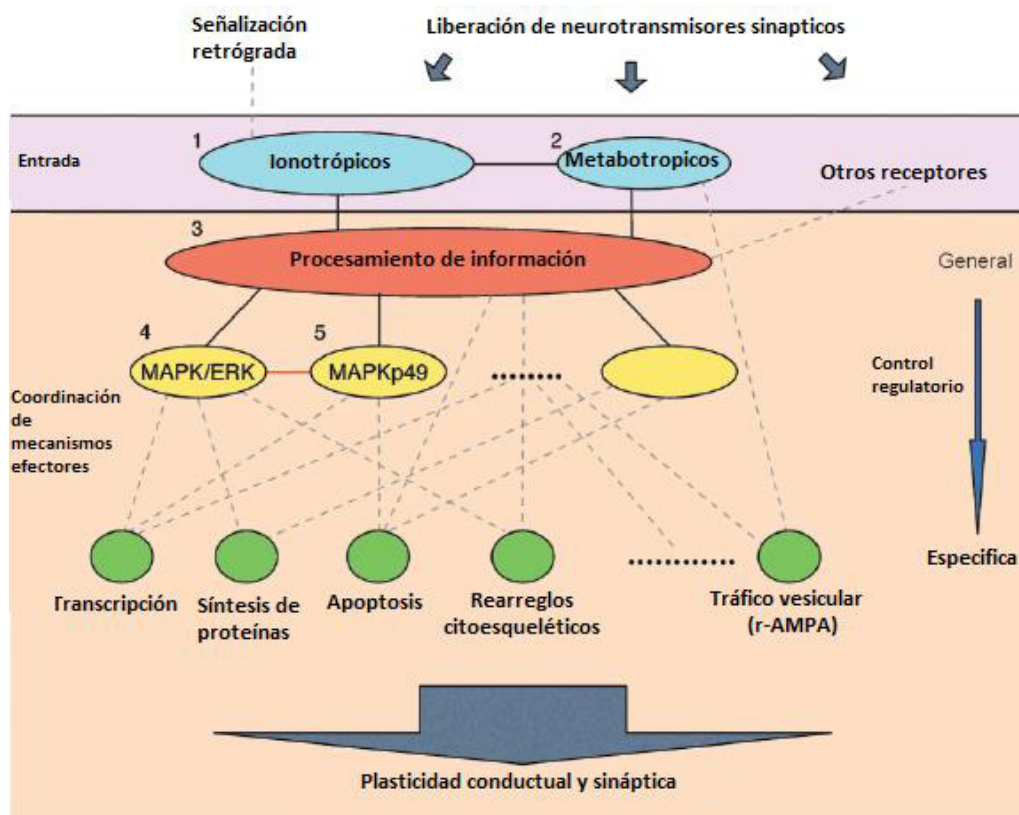


Figura 1. Procesamiento de información presináptica. Modificado de (Laumonnier et al., 2007).

1.3 Neurodesarrollo

En cuanto al SNC, éste se comienza a desarrollar desde las etapas embrionarias tempranas hasta la etapa postnatal temprana mediante la neurogénesis (Urbain et al., 2014), en la cual múltiples procesos biológicos trabajan en concierto para asegurar que los diversos tipos de células nerviosas proliferen, se diferencien, migren y formen sinapsis en el momento y lugar apropiado, siendo un mecanismo finamente regulado, dependiente de la apropiada expresión temporal y espacial, así como del correcto funcionamiento de diferentes productos génicos como los diversos tipos de ARN y proteínas (Jensen et al., 2004).

Durante la etapa embrionaria de los embriones vertebrados, el desarrollo del SN es inducido en el ectodermo por el notocordio, seguido del desarrollo de las regiones distintivas del SNC y del tubo neural (Paridaen et al., 2014) a partir del cual se diferenciarán la médula espinal y el cerebro (Semple et al., 2012). En conjunto con este proceso, se comienza a llevar a cabo la diferenciación de células progenitoras neuronales (NPC) a neuronas (Vied et al., 2014), un mecanismo caracterizado por la formación inicial de neuritas inmaduras en las NPC. Las neuritas inmaduras se desarrollan en un axón y múltiples dendritas, seguido de la maduración de la neurona y la formación de las espinas dendríticas (Bromberg et al, 2008). Por todo lo anterior, las etapas tempranas del desarrollo son las más dinámicas en cuanto a los niveles de expresión génica (Figura 2).

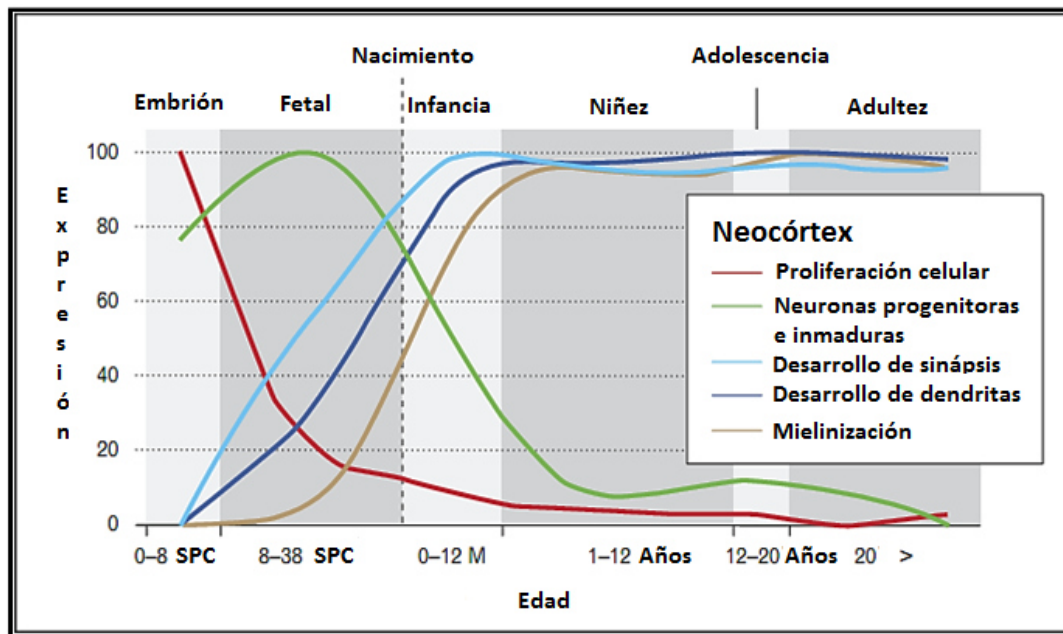


Figura 2. Línea de tiempo de desarrollo del neocórtex de ratón. Modificado de (Tebbenkamp et al., 2012).

Cuatro clases de procesos biológicos de GeneOntology (Ashburner, 2000) se han identificado como claves en el desarrollo del SN (Jensen et al., 2004), los cuales son:

- Comunicación celular.
- Procesos fisiológicos celulares.
- Metabolismo.
- Morfogénesis.

Se estima que aproximadamente 10,000 genes se expresan en todo el SNC (Ropers, 2007), la mayoría de los cuales son indispensables para el correcto funcionamiento del mismo. En consecuencia, las mutaciones que alteren la

correcta expresión y/o función de un gen involucrado en la neurogénesis y/o en el mantenimiento del SNC pueden contribuir a la iniciación y/o progresión de diversos desórdenes neurológicos, los cuales incluyen un amplio espectro de enfermedades mentales, con síntomas que varían desde conductas maniacas y depresión, hasta esquizofrenia y autismo, siendo la discapacidad intelectual (DI) (Han et al., 2014) –antes conocida como retraso mental (Robert et al., 2007)–una de las afecciones más representativas de estos defectos génicos en el sistema nervioso central, en los seres humanos.

1.4 Discapacidad intelectual

La DI es una condición que se origina antes de los 18 años y se caracteriza por significativas limitaciones en el funcionamiento intelectual y en el comportamiento adaptativo, manifestándose en las habilidades conceptuales, sociales y prácticas (Schalock et al., 2010). Esto implica una deficiencia en las destrezas necesarias para el desarrollo de la vida diaria independiente (Majluf et al.) y en las habilidades de aprendizaje, razonamiento, resolución de problemas y relación con el entorno.

Con base a la definición anterior, los criterios para el diagnóstico de la DI son los siguientes (Schalock et al., 2010):

- Funcionamiento intelectual significativamente inferior al promedio.
- Deficiencias significativas en la función adaptativa.
- Inicio antes de los 18 años de edad.

Existen diversos factores etiológicos por los cuales un individuo puede desarrollar una DI u otras afecciones neurológicas, entre los que se encuentran:

- Anomalías cromosómicas y defectos genéticos:
 - Deleciones.
 - Duplicaciones.
 - Inversiones.
 - Translocaciones.
 - Alteraciones epigenéticas.
- Factores ambientales:
 - Infección intrauterina o extrauterina.
 - Prematuridad.
 - Exposición a toxinas.
 - Factores metabólicos.
 - Factores nutricionales.
 - Traumatismos antes o después del nacimiento.
 - Privación social.

La DI es el desorden con el mayor costo socio-económico en países desarrollados (Ropers, 2007), que no solo afecta a aquel que la padece, sino a todas las personas involucradas en su cuidado y manutención, ya que las personas con esta discapacidad, comúnmente no pueden hacer frente a sus necesidades, y necesitan una atención y ayuda constantes. Además, esta discapacidad suele estar asociada estrechamente con otros trastornos congénitos como malformaciones múltiples, evidentes o no, y errores del metabolismo, dando lugar así, a una discapacidad intelectual sindrómica, lo cual ocurre en alrededor del 50% de los casos (Vandeweyer et al., 2009). En la DI no sindrómica, el individuo tiene una DI aislada, sin otros trastornos o malformaciones.

Las pruebas más comunes para evaluar la DI son el test de coeficiente intelectual (CI), la evaluación del desarrollo del niño y su comportamiento de adaptación (Kaneshiro, 2013).

De estas pruebas, la de CI brinda una buena idea de la gravedad de la DI. Este test pretende expresar numéricamente el nivel intelectual de una persona, relacionando la edad cronológica, con la edad mental o grado de inteligencia del individuo, comparado con el resto de personas de su misma edad cronológica (Alsina et al., 2004).

La DI se caracteriza por un coeficiente intelectual general menor a 70 (Schalock et al., 2010; Vandeweyer et al., 2009), a partir de la cual se clasifican en 5 grupos según la gravedad de la DI (MSPSI, 2012).

- DI leve (CI 50 a 69).
- DI moderada (CI 49 a 35).
- DI grave (CI 34 a 20).
- DI profunda (CI < 20).
- DI no especificada (imposible definir).

Como la mayoría de las alteraciones neuropsiquiátricas, la DI es un desorden que normalmente se mantiene durante toda la vida del individuo, y tiene una frecuencia estimada de entre el 1 y el 3% de la población, de la cual el 0.4% se encuentra afectada por DI moderada a profunda (CI < 50) (Shawky et al., 2011; Vandeweyer et al., 2009).

No existe en la actualidad un tratamiento para efectivamente curar los casos de DI, exceptuando cuando esta condición se origina a partir de un trastorno metabólico tratable, donde la administración externa o la eliminación de la ingesta de un metabolito, puede lograr una reversión de la DI o evitar su progresión, como es el caso de los recién nacidos con fenilcetonuria (Patel, 2013). Aun así, en la mayoría de los casos, la calidad de vida de las personas afectadas puede mejorar con los apoyos y estimulaciones adecuadas,

proporcionados desde el nacimiento y por periodos continuados de tiempo, especialmente en los casos de discapacidad leve, donde los individuos pueden llegar a realizar trabajos sencillos y tener cierta independencia.

La etiología de esta afección, así como de la mayor parte de las enfermedades mentales, es enormemente heterogénea, con cientos de genes involucrados, afecciones cromosómicas y factores ambientales, lo cual puede ocasionar los diferentes grados de esta discapacidad, y en promedio la incidencia es mayor en hombres que en mujeres (1.7:1.0), debido a que un porcentaje importante de síndromes de causa genética que cursan con discapacidad intelectual se encuentran ligados al cromosoma X (Alsina et al., 2004).

Los desórdenes cromosómicos y genéticos suelen explicar alrededor del 30-40% de los casos, mientras que los factores ambientales explican entre el 10-30%, y en alrededor de un 40-50%, el origen de la discapacidad es desconocida (González et al, 2013; Shawky et al., 2011).

Existen diversos estudios que se pueden realizar para tratar de encontrar la causa de la DI en un individuo, entre los que se encuentran análisis de neuroimagen, estudios metabólicos, citogenéticos y moleculares, destacando el uso de los microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH), los cuales, permiten un análisis genómico completo de la mayor parte de las alteraciones posibles, que pueden dar lugar a este fenotipo, permitiendo un

mayor rendimiento y costo-beneficio (González et al., 2013), especialmente cuando no se logra encontrar la afección que origina la discapacidad mediante los métodos anteriores. Sin embargo, aún con esta tecnología, la causa de esta discapacidad permanece desconocida en alrededor de la mitad de los casos diagnosticados, lo cual indica que hacen falta mayores estudios de la etiología de la DI, así como de muchas otras enfermedades neuronales, especialmente desde el punto de vista genético (Majluf, Shawky et al., 2011; Vandeweyer et al., 2009).

El hecho de que la mayoría de las alteraciones cromosómicas cursen con una DI, indica que probablemente la haploinsuficiencia de un gran número de genes conlleven a esta discapacidad (Bugge et al., 2000). Por lo menos 300 diferentes genes han sido relacionados con la DI hasta la fecha, sin embargo el número real de genes involucrados con esta condición se estima en miles, la mayoría de los cuales todavía se desconocen (Ropers, 2007), y se hace necesario el identificarlos. La asociación de desórdenes cromosómicos *de novo*, con la DI en diversos individuos, ha permitido el descubrimiento de regiones y genes que generan esta afección (Laumonnier et al., 2007). Uno de estos desórdenes son las translocaciones equilibradas, que son el producto de un evento de recombinación entre 2 cromosomas, sin pérdida aparente de material cromosómico (Vandeweyer et al, 2009), y con ocurrencia prácticamente en cualquier lugar del genoma humano.

1.5 Translocaciones equilibradas

Las translocaciones equilibradas e inversiones, ocurren en aproximadamente en el 0.1% de los recién nacidos (Jensen et al., 2004), y aunque la mayoría están asociadas a desórdenes bien conocidos, o síndromes reportados, estos reacomodos pueden estar asociados a una variedad de diferentes fenotipos (Bugge et al., 2000) sin etiología definida, incluyendo la DI.

Estos reacomodos cromosómicos equilibrados asociados a enfermedad (RCBAEs), normalmente se pueden detectar mediante un cariotipo convencional, y alrededor del 6% de éstos, están asociados con anormalidades clínicas como la DI, sindrómica o no sindrómica.

Estos RCBAEs que truncan, o que de alguna otra forma inactivan genes específicos, han sido instrumentos en el descubrimiento de varios genes causantes de afecciones neurológicas, y forman un puente entre el genotipo y el fenotipo de esta afectación (Ropers, 2007). Las translocaciones pueden llegar a interrumpir sólo un gen, permitiendo su identificación y su correlación con la afección, por lo que, el mapeo sistemático de los puntos de ruptura de los pacientes con estos reacomodos cromosómicos equilibrados, se ha propuesto como una estrategia eficiente para la elucidación de las causas moleculares para diferentes afecciones (Ropers, 2007; Shoichet et al., 2006). Un ejemplo de esto es que muchos de los primeros genes relacionados con la DI se detectaron mediante la caracterización molecular de translocaciones equilibradas, como es

el caso de los genes *TM4SF2*, *ARHGEF6* y *ZNF41*, así como otros mas recientes (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos genes relacionados con DI, que fueron detectados a través de una translocación equilibrada.

<i>Genes</i>	<i>Translocación</i>	<i>Asociación</i>	<i>Autor</i>
<i>JNK3</i>	t(Y;4)(q12;q21.3)	DI y convulsiones.	(Kunde et al., 2013)
<i>MED13L</i>	t(12;19)(q24;q12)	DI y malformaciones múltiples.	(Utami et al., 2014)
<i>ARID1B</i> y <i>MRPP3</i>	t(6;14)(q25.3;q13.2)	DI y agenesia del cuerpo calloso.	(Backx et al, 2011)
<i>KCNMA1</i>	t(9;10)(q23;q22)	DI y autismo.	(Laumonnier et al., 2006)
<i>GRIA3</i>	t(X;12)(q24;q15)	DI y trastorno bipolar.	(Géczy et al., 1999)
<i>ZMIZ1</i> y <i>PRR12</i>	t(10;19)(q22.3;q13.33)	DI y alteraciones neuropsiquiátricas.	(Córdova-Fletes et al., 2015)

Además de los efectos causados por su haploinsuficiencia, la interrupción de 2 genes por una translocación recíproca puede dar lugar a la formación de transcritos de fusión, lo cual ocurre cuando ambos genes se encuentran orientados en la misma dirección, y el marco de lectura abierta se conserva, por lo que es posible que uno o ambos transcritos logren expresarse y ejerzan un efecto dominante negativo, o que se desenmascare una mutación heterocigota (Backx et al, 2011). La formación de estos transcritos de fusión se encuentra reportada en malignidades adquiridas, pero es muy raramente observada en pacientes con DI (Backx et al, 2011), ya que estos transcritos comúnmente se eliminan por decaimiento del ARNm, ya sea por codones con pérdida de

sentido, por encontrarse truncado el ARNm o por poseer codones de terminación prematuros (Kunde et al., 2013; Shoichet et al., 2006).

Una vez determinado el gen que se encuentra afectado por una translocación, existen diferentes abordajes experimentales para determinar su relación con el fenotipo del individuo. Actualmente, uno de los métodos de análisis, consiste en realizar el silenciamiento de la expresión del gen que se asocia con una condición específica mediante ARN de interferencia (ARNi) en un modelo experimental como células en cultivo o ratones (knock down), para realizar un análisis de expresión después del tratamiento con el ARNi y poder así determinar los genes, vías de señalización y procesos biológicos que se ven involucrados al perderse la expresión de dicho gen.

Poco después del descubrimiento de la interferencia de ARN mediada por ARN de doble cadena (ARNdc), el silenciamiento génico a través de la interferencia de ARN se convirtió en una poderosa técnica en el estudio funcional de los genes. Este mecanismo de silenciamiento post-transcripcional específico de secuencia, implica ARN's de doble cadena, homólogos a la secuencia del ARNm a ser silenciado y asociados a un "complejo silenciador inducido por ARN" (RISC), lo cual permite la hibridación del ARNi con su ARNm diana para la eliminación de éste mediante RISC (Harborth et al., 2001; Vázquez et al., 2006).

El silenciamiento sistemático de genes permite interrogar la función de un gen a la vez, logrando descubrir y entender las funciones biológicas básicas y las vías de señalización en las que se ve implicado (Bai, 2012).

En conjunto con esto, y con la llegada de los microarreglos de expresión génica, el análisis de transcritos de todo el genoma, conocido como patrón de expresión, ya sea de células o tejido, puede ser llevado a cabo rápidamente proporcionando una capacidad de análisis de la respuesta transcripcional de uno o varios genes ante un estímulo, sea éste una mutación, enfermedad, o proceso químico. Así, un solo ensayo brinda información tanto cualitativa como cuantitativa de qué genes y en qué medida se ven afectados ante dicho estímulo. En gran medida, esto ha permitido la identificación diferencial de genotipos/firmas de expresión, asociados a diferentes patologías (Hughes et al., 2000; Land, 2000).

Combinando el análisis de los patrones de expresión con la bioinformática y la interferencia de ARN, se establece un marco de trabajo en el que las hipótesis científicas pueden ser establecidas para investigar la función de un gen (Bugge et al., 2000) y su relación con una condición específica de un organismo.

Capítulo II

ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes directos

Nuestro grupo de trabajo identificó por primera vez la ruptura de los genes *PRR12* y *ZMIZ1* por una translocación equilibrada entre los cromosomas 10 y 19, en una paciente con discapacidad intelectual, alteraciones neuropsiquiátricas y múltiples malformaciones menores. Ninguno de estos genes había sido reportado como relacionado con la DI, ni otras alteraciones neuronales, y aunque se sabe que el gen *ZMIZ1* codifica para una proteína miembro de la familia de inhibidores de proteínas activados por *STAT*, regula la actividad de varios factores de transcripción, incluyendo al receptor de andrógenos (AR), *SMAD3*, *SMAD4*, *p53* y se ve involucrada en procesos de sumoilación (NCBI, 2010). Este gen tiene expresión en pocos tejidos del sistema nervioso central (HPA 2015; Hruz et al., 2008) comparado con el producto del gen *PRR12*, siendo además este último, un blanco deseable de analizar debido a la poca información que se conoce sobre él y sus implicaciones, por lo que se pretende realizar la evaluación del perfil transcripcional y vías de señalización en las que se encuentra involucrado el producto del gen *PRR12*.

2.2 Proline Rich 12

El gen *PRR12* (proline rich 12), antes conocido como *KIAA1205* se describió por primera vez en 1999 por Nagase y colaboradores., en un abordaje global para identificar ADNc que codifican para proteínas grandes en tejido cerebral (Nagase et al., 1997). Este gen se encuentra en el cromosoma 19 en el ser humano, en la región 19q13.33, cuenta con ~34.7 Kb, y codifica para 14 exones, que dan lugar a 3 isoformas (2 de las cuales son predichas, de 121.9kDa y 211kDa) (Ensembl, 2015; NCBI, 2015), de las cuales la forma canónica se traduce en una proteína de 1,215aa's y 129.9 kDa (Uniprot, 2014) con una función hasta la fecha totalmente desconocida.

Esta proteína se encuentra altamente conservada en una amplia diversidad de organismos (NCBI, 2015), además de una localización basal en casi todos los órganos del cuerpo, con una notable concentración en SNC (córtex, cerebelo, hipotálamo, y ventrículos) (HPA, 2015), lo que puede indicar una función importante conservada durante la evolución, la cual no se ha establecido.

Se ha determinado además, que la proteína PRR12 contiene 2 sitios de unión al ADN (A.T hook), un dominio de función desconocida (DUF4211) y 2 zonas ricas en prolina (Córdova et al., 2015; Uniprot, 2015) (Figura 3), una de las cuales se encuentra en posición N-terminal, lo que sugiere un rol en el ensamblaje de grandes complejos proteicos, mediante el reconocimiento de diferentes dominios tales como SH3, WW, EVH1 y GYF.

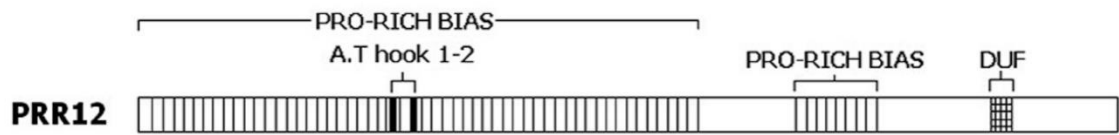


Figura 3. Representación de PRR12 (Córdova-Fletes et al., 2015).

PRR12 posee también múltiples sitios de fosforilación y un residuo de lisina prono a acetilación (N6-acetilisina) reversible.

La detección por nuestro grupo de trabajo de la proteína PRR12 en núcleo y en regiones de sinapsis (Córdova et al., 2015) junto con el hecho de que proteínas con dominios A-T hook (e.g. MeCP2 (Baker et al., 2013)) o residuos N6-acetil lisina (Choudhary et al., 2009) se han asociado con remodelación de la cromatina y son cofactores transcripcionales, sugiere que *PRR12* puede participar, entre otros procesos celulares (e.g. diferenciación celular), como un factor de transcripción en la regulación de proteínas relacionadas con la sinapsis, a través de la formación de grandes complejos de transcripción y modificación de la cromatina (Córdova et al., 2015).

Capítulo III

JUSTIFICACIÓN

Debido al alto porcentaje de casos de discapacidad intelectual y otros trastornos neurológicos que permanecen sin una etiología definida, es necesario el análisis de aquellos genes candidatos que puedan dar origen a estas condiciones, como lo es el caso del gen *PRR12*, el cual se encontró truncado por una translocación equilibrada en una paciente con discapacidad intelectual y múltiples alteraciones neuropsiquiátricas, sin causas externas aparentes.

Además de esto, su tasa de conservación en diferentes especies y su localización basal en prácticamente todo el organismo, especialmente en SNC, sugieren una función importante en el mantenimiento y/o desarrollo del organismo, la cual hasta el momento no se ha identificado, y lo convierte en un blanco deseable para el análisis de las vías de señalización en las que participa.

Capítulo IV

HIPÓTESIS

El gen *PRR12* es un factor de transcripción que regula la expresión de genes asociados a comunicación neuronal y/o procesos del neurodesarrollo, por lo tanto, su inhibición conduce a una desregulación de las vías de señalización correspondientes.

Capítulo V

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Describir los genes que son potencialmente regulados por *PRR12* y, a partir de ello, analizar las posibles vías y procesos de comunicación neuronal afectados tras su inhibición.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el nivel de expresión relativo de *PRR12* en homogenizado total de cerebro de rata, en diferentes etapas del desarrollo (embrionaria, postnatal y adulta), así como su presencia en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.
2. Realizar la inhibición del ARNm de *PRR12* en la línea celular C6.
3. Establecer el perfil de expresión global de la línea celular C6 y evaluar los cambios en las vías de comunicación tras la inhibición de la expresión de *PRR12*.
4. Realizar un análisis de significancia biológica, y proponer posibles rutas de señalización y etapa del desarrollo en las que se ve involucrado el gen *PRR12*.

Capítulo VI

MATERIALES Y EQUIPOS

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos, del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.1 Materiales

6.1.1 Material de uso general.

- Micropipeta de 100 a 1000 μ L, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 20 a 200 μ L, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 10 a 100 μ L, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 2 a 20 μ L, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 0.5 a 10 μ L, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 0.1 a 2.5 μ L, marca Eppendorf Research Plus.
- Tubos de 15mL, marca Corning.
- Tubos de 50mL, marca Corning.
- Toallas desechables de papel “sanitas”, marca Kimberly Clark.
- Puntillas desechables para micropipeta, de 1000 μ L, marca SSI.
- Puntillas desechables para micropipeta, de 200 μ L, marca SSI.
- Puntillas desechables para micropipeta, de 10 μ L, marca SSI.

- Puntillas con filtro, desechables, para micropipeta de 1000 μ L, marca Vertex.
- Puntillas con filtro, desechables, para micropipeta de 200 μ L, marca Vertex.
- Puntillas con filtro, desechables, para micropipeta de 10 μ L, marca Vertex.
- Microtubo de 2mL, marca SSI.
- Microtubo de 1.5mL, marca SSI.
- Microtubo de 0.2mL, marca SSI.

6.1.2 Material para cultivo celular.

- Pipeta serológica 10mL, marca Nunclon.
- Pipeta serológica 5mL, marca Nunclon.
- Pipeta serológica 1mL, marca Nunclon.
- Placas Petri de 150mm para cultivo, marca Nunclon.
- Botellas de 15cm² de rosca, para cultivo, marca Nunclon.
- Raspador celular de 25cm, marca Corning.
- Placa de 24 pozos para cultivo celular, marca Nunclon.
- Crioviales de 2mL, marca Corning.

6.1.3 Material para qPCR.

- Tubos ópticos para qPCR, tiras de 8 tubos, marca Applied Biosystems.
- Tapas ópticas para tubos de PCR, tiras de 8, marca Applied Biosystems.

6.1.4 Microarreglo.

- Microarreglo SurePrint G3 Rat GE 8x60k, marca Agilent Technologies.

6.2 Equipos.

6.2.1 Equipo de uso general.

- Minicentrífuga *centrifuge* 5415 C, marca Eppendorf.
- Plancha de calentamiento, marca Thermolyne.
- Vortex, marca Thermolyne.
- Nanodrop 2000, marca Thermo Scientific.
- Minispin, marca Labnet.
- Fotodocumentador ChemiDoc XLR+, marca Bio-Rad.
- Congelador vertical, -80°C, marca So-Low.
- Plataforma SureScan, marca Agilent Technologies.

6.2.2 Equipo para cultivo celular.

- Microscopio invertido marca Olympus.
- Pipetor Pipet-Aid XP marca Drummond.

- Campana de flujo laminar LV-120 marca Lumistell.
- Incubadora con fuente de CO₂ marca NuAire.

6.2.3 Manejo de ácidos nucleicos.

- Campana para PCR, marca UVP.
- Termociclador SureCycler 8800, marca Agilent Technologies.
- Termociclador para qPCR 7500 fast, marca Applied Biosystems.
- Cámara de electroforesis Mini-Sub cell GT, marca Bio-Rad.
- Fuente de poder PowerPac Basic, marca Bio-Rad.
- Horno de microondas, marca LG.

Capítulo VII

METODOLOGÍA

7.1 Tipo de estudio

- Analítico, experimental, transversal y prospectivo.

7.2 Estrategia general

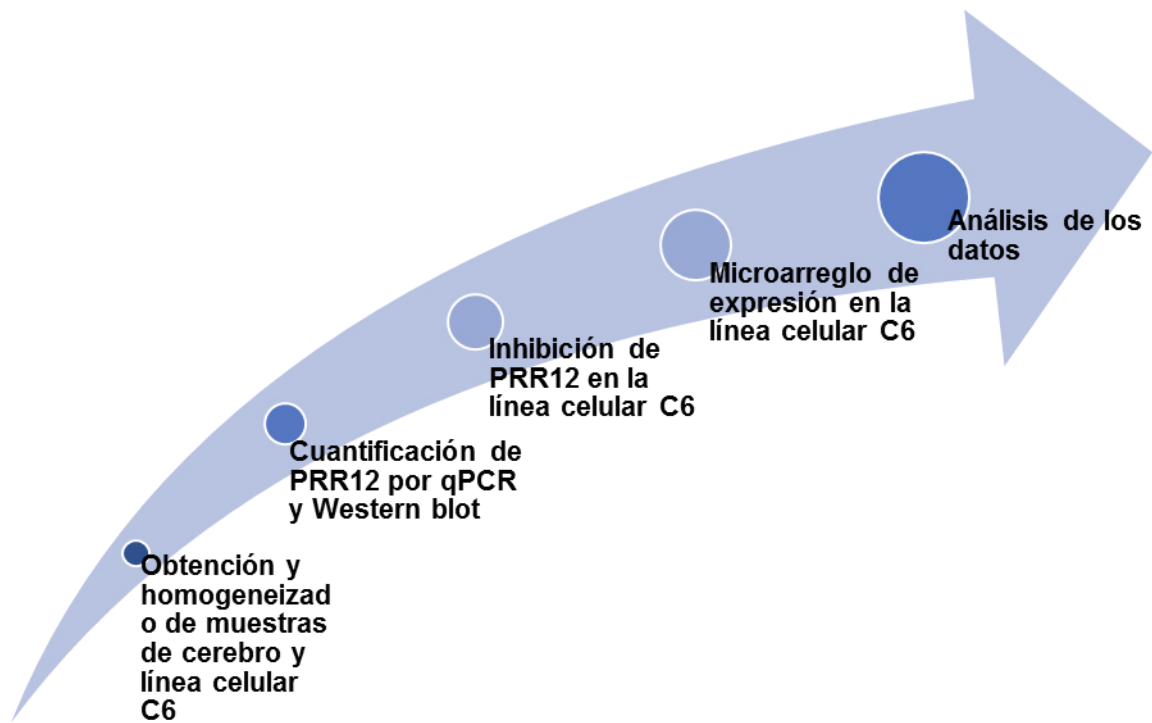


Figura 4. Diagrama de estrategia experimental.

7.3 Obtención de cerebros

Con el propósito de determinar la concentración relativa de *PRR12* en diferentes etapas de la vida, especialmente durante el neurodesarrollo, se utilizó como modelo experimental la rata, cuya proteína *PRR12* presenta una alta homología con la proteína humana (94%), además de ser un modelo experimental disponible y fácil de mantener. Así, para este estudio se utilizaron ratas Wistar Kyoto, las cuales fueron mantenidas en bioterio, con comida y agua ad libitum, y ciclos de luz-oscuridad de 12h (Figura 5).



Figura 5. Rata hembra utilizada para el estudio.

Todos los cerebros de rata de las diferentes etapas (embrión, neonatal y adulto) se obtuvieron mediante decapitación con guillotina o tijeras de disección y posterior corte longitudinal de la tapa del cráneo, para obtener el cerebro expuesto y poder recolectarlo en solución salina fría (NaCl 0.9%), dividiendo después los cerebros por el plano sagital mediante bisturí, separando el hemisferio izquierdo y el hemisferio derecho (utilizados para extracción de ARN y proteínas respectivamente).

Cada hemisferio se colocó en tubos estériles libres de nucleasas y proteasas de 1.5mL (SSI) en el caso de embriones y neonatos, y 15mL (Corning) en el caso de adultos, de forma individual, congelándolos inmediatamente en hielo carbónico (aprox. -78°C). Todos los cerebros se almacenaron en congelador vertical (So-Low) a -80°C hasta su utilización.

Para obtener los embriones de rata en la etapa deseada (E14-E15), se colocaron en diferentes cajas un macho y una hembra adultos (2 a 5 meses de edad) por 48h, permitiendo su copulación. Pasadas las 48h se retiraron los machos y se dejaron las hembras en sus cajas individuales, para ser evaluadas posteriormente a los 15 días a partir de que se conjuntaron machos y hembras, con el fin de determinar cuáles hembras se encontraban preñadas. Se encontró 1 rata preñada, la cual se sacrificó por decapitación con guillotina y a partir de la cual se obtuvo su cerebro mediante las condiciones antes descritas.

Al cuerpo de la rata preñada se le realizó un corte en el abdomen con el fin de exponer el útero y los sacos embrionarios. Se obtuvieron los embriones de cada uno de los sacos embrionarios mediante corte con tijeras, descartando aquellos que no se habían formado correctamente, y cada embrión fue decapitado a su vez, por corte con las tijeras, siendo depositadas las cabezas completas en solución salina fría para posteriormente obtener los cerebros embrionarios (8 cerebros totales).

Para obtener los cerebros de la rata neonata, se colocaron en una misma caja una hembra y un macho adultos, permitiendo su copulación, y manteniéndolos juntos hasta el nacimiento de las crías.

Debido a que el periodo aproximado de gestación de una rata es de entre 22 y 24 días (TSR, 2015), a partir de los 15 días de permitida la copulación de las ratas, se realizaron 1 o 2 revisiones diarias de las condiciones de la hembra preñada, determinando el nacimiento de las crías a los 24 días después de colocada la pareja en la misma caja.

Unas horas después del nacimiento de las crías, la rata hembra y macho adultos, junto con todas las crías, fueron sacrificadas y se obtuvieron sus cerebros de la forma antes descrita, obteniendo 14 cerebros de rata neonata y otros 2 cerebros de rata adulta.

Para obtener un mayor número de muestras de rata adulta se sacrificó otra rata de entre 2 y 5 meses mediante las condiciones antes descritas, obteniendo al final 4 cerebros completos de rata adulta, los cuales se utilizaron para los análisis de proteína y ARNm de *PRR12*.

7.4 Obtención y cuantificación de proteínas totales

Se realizó la cuantificación de proteína a partir tanto del homogeneizado de cerebro total de las diferentes etapas de desarrollo de la rata (embriones,

neonatos y adultos), como de cultivo de la línea celular C6 de glioblastoma de rata, con la finalidad de determinar si esta línea celular podía ser utilizada para los ensayos de inhibición de *PRR12* (Figura 6).

Para la obtención de las proteínas totales del cultivo celular de la línea C6, se tomaron 2 placas Petri de 150mm (Nunc) con cultivo de la línea celular a una confluencia de alrededor del 90%, crecida en las condiciones descritas en el anexo I.

A cada una de las placas Petri se le retiró por completo el medio de cultivo y fueron lavadas con TBS (Tris 50nM, NaCl 150nM, pH 7.5), posteriormente se añadieron 200μL de TBS frío, con inhibidores de proteasas, y las células fueron rastrilladas, recolectando después el buffer resultante con las células en suspensión, en 2 tubos de 1.5mL estériles (SSI).

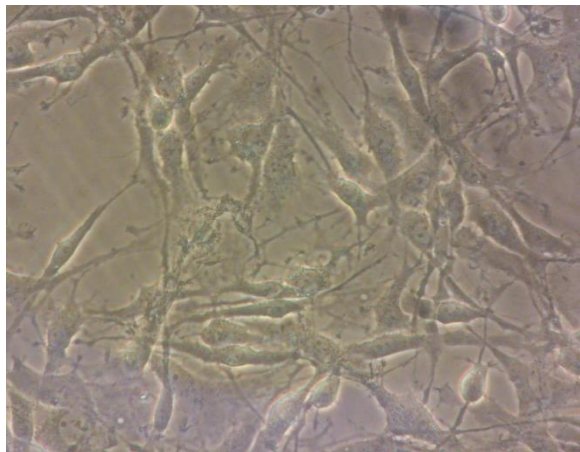


Figura 6. Morfología de la línea celular C6 de glioblastoma de rata (aumento 40X).

Una vez obtenidas las células en suspensión en TBS con inhibidores de proteasas, estas fueron homogeneizadas mediante sonicación con un sonicador

de punta (Qsonica “Q125”) utilizando 3 ciclos de 6 pulsaciones de 1 segundo cada una, con una amplitud del 80% y enfriando las muestras en hielo entre cada ciclo.

Una vez homogeneizadas las células, se realizó la cuantificación de proteína total. Para esto, en placas de 96 pozos (Nunc) se cargaron entre 1 μ L y 2 μ L del homogeneizado celular por cuadruplicado, y en cada placa con muestras se realizó una curva de calibración con albúmina (J.T. Baker) a concentraciones de 0.5 μ g a 5 μ g por cuadruplicado, la cual se utilizó para determinar la concentración de proteína por μ L de muestra.

A cada uno de los pozos con muestra o curva de calibración, así como a 4 pozos control negativo, se le añadieron 200 μ L de reactivo de Bradford (Quick Start Bradford 1x, Bio-Rad), para ser determinada posteriormente la absorbancia a 595nm, longitud de onda a la cual absorbe el reactivo de Bradford al haber reaccionado con proteínas, para lo cual se escanearon las placas en un lector de placas de 96 pozos (iMark, Bio-Rad), con previa agitación de la placa a velocidad media durante 15s.

Utilizando el software Excel (Microsoft Office, 2013) se graficaron las absorbancias obtenidas por la curva de concentración, contra las diferentes concentraciones probadas, para obtener una gráfica lineal a partir de la cual se obtuvo la ecuación de la recta, permitiendo determinar la concentración de las muestras según sus niveles de absorbancia, mediante su interpolación en la recta.

Para obtener la concentración proteica total de los hemisferios derechos de rata, a las muestras de cerebro embrionario y de cerebro neonatal se les añadieron 100µL y 200µL respectivamente de TBS con inhibidores de proteasas, y se realizó el homogeneizado de los cerebros mediante 6 ciclos de sonicación de 6 pulsaciones de un segundo cada una, a una amplitud del 90%, enfriando las muestras en hielo entre cada ciclo. Para los hemisferios derechos de rata adulta, estos fueron primero homogeneizados mecánicamente en un homogeneizador de vidrio-vidrio, con 5mL de TBS con inhibidor de proteasas, para posteriormente someterse de igual forma a 6 ciclos de sonicación de 6 pulsaciones de 1 segundo cada una, a una amplitud del 90% y enfriando las muestras en hielo entre cada ciclo.

Para realizar el análisis de concentración proteica de cada muestra, se añadieron entre 0.5µL y 2µL de cada muestra de homogeneizado de cerebro, o su dilución, por cuadruplicado en placas de 96 pozos (Nunc), realizando una curva de calibración con albúmina (J.T. Baker) a concentraciones de entre 0.5µg y 5µg en cada placa con muestras, cada punto de la curva por cuadruplicado y un control negativo.

De igual manera que con las muestras anteriores, se añadieron 200µL de reactivo de Bradford a cada pozo con muestra o curva estándar y se tomó la absorbancia de los pozos a 595nm mediante un lector de placas de 96 pozos (iMark, Bio-Rad), con previa agitación de la placa a velocidad media por 30s,

para posteriormente obtener la ecuación de la recta, de la curva de calibración y de ella obtener los valores de concentración de proteínas por μL de muestra.

Una vez obtenidos los valores de concentración proteica total, se procedió a utilizar estos homogeneizados para realizar los respectivos ensayos de Western blot para las muestras de cultivo celular y hemisferios derechos de las diferentes etapas de desarrollo de la rata.

7.5 Western blot

Para la realización de los Western blot, se tomó el equivalente a $50\mu\text{g}$ de proteína total tanto de homogeneizado de cultivo de la línea celular C6, como de los homogeneizados de hemisferio derecho de cerebro de rata, en tubos de 1.5mL (SSI) y se desnaturalizaron las proteínas añadiendo un 20% de volumen total, de buffer de carga 5X (agua 35.5%, tris-HCl 12.5%, glicerol 25%, SDS 20%, azul de bromofenol 2% y β -Mercaptoetanol 5%). Todas las muestras se aforaron con TBS a un volumen de $30\mu\text{L}$ por reacción, calentando la mezcla a 90°C por 10min en bloque de calentamiento (Labnet) o baño de agua.

Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de acrilamida al 6% (Solución de acrilamida/bis-acrilamida 30% Bio-Rad) y 1mm de grosor, en condiciones desnaturalizantes (Buffer de corrida: Tris base 3.03%, glicina 14.4%, SDS 10%), cargando $30\mu\text{L}$ de las proteínas previamente desnaturalizadas, utilizando el

primer carril para cargar el marcador de peso molecular Spectra Multicolor (Thermo scientific). La electroforesis vertical se corrió a 80v (fuente de poder PowerPac basic, Bio-Rad) por aproximadamente 90min en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad). Se realizó la electroforesis cargando cada una de las 2 muestras de cultivo celular, y cargando 6 muestras de cerebro de embrión, 6 muestras de neonato y 4 muestras de adulto.

Una vez terminada la electroforesis, se separó el gel de acrilamida de las placas de vidrio y se colocó sobre un papel filtro, colocando encima del gel una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare), previamente hidratada con agua miliQ y a su vez encima de ésta, otro papel filtro, realizando de esta forma un “sándwich” manteniendo presionado el gel de acrilamida contra la membrana de nitrocelulosa, para después colocarlo en la cámara de transferencia Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad). Así, se realizó la electroforesis horizontal para la transferencia de proteínas, en frío, primero a 30v por 16h y posteriormente aumentando a 80v por 3 horas, debido al alto peso molecular de la proteína PRR12 (211.4kDa), lo cual dificultó su transferencia. Terminada la transferencia de proteínas, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 5mL de solución de albúmina (J.T. Baker) al 5% disuelta en TBS, mediante agitación en tubo de 50mL (Corning) durante un tiempo $\geq 2h$.

Posterior al bloqueo, la membrana se enjuagó una vez con TBS y se incubó con el anticuerpo primario de conejo anti-PRR12 humano (Abcam) (aprovechando la alta homología entre el epítipo reconocido por el anticuerpo en la proteína del ser humano y la de rata (>91%), y a que no existe hasta el momento, un anticuerpo comercial contra PRR12 de rata), en solución de TBS-T (Tween 20, Sigma-Aldrich al 1%) a una relación de 1:300, dejando incubar por toda la noche a 4°C, en agitación.

Después de la incubación, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con TBS-T, en tubo de 50mL (Corning), con agitación, incubando después con anticuerpo secundario anti-conejo (Thermo Scientific) en solución de albúmina al 5%, a una relación de 1:7000. La incubación se realizó por 1h en tubo de 50mL (Corning), en agitación, realizando de nuevo 4 lavados de 5min con TBS-T y un último lavado de 5min con TBS, debido a que el tween 20 puede interferir con el revelado de la membrana.

Terminados los últimos lavados, la membrana se procedió a revelar en fotodocumentador (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad), utilizando una solución de peróxido de hidrógeno y luminol (Sustratos Clarity Western ECL 1:1, Bio-Rad), observando la quimioluminiscencia mediante el software Image Lab.

Una vez revelada la proteína PRR12, se procedió a enjuagar la membrana con TBS-T y a incubarla por 2h, con una mezcla de anticuerpo anti-actina (Thermo Scientific) y anti-tubulina de rata (Thermo Scientific) (1:2500 y 1:4000), producidos en ratón, realizando de nuevo 4 lavados de 5min con TBS-T e

incubando con anticuerpo anti-ratón por 30min, en agitación, procediendo a lavar de nuevo la membrana 4 rondas de 5min con TBS-T y 1 ronda de 5min con TBS. Enseguida, se procedió a revelar los controles de carga por quimioluminiscencia en el fotodocumentador (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad), utilizando la solución de peróxido de hidrógeno y luminol (Sustratos Clarity Western ECL 1:1, Bio-Rad).

Teniendo las imágenes de las bandas de PRR12, actina y tubulina, se realizó el análisis de densitometría de las mismas con el programa ImageJ v1.48, realizando los cálculos de concentración proteica relativa de PRR12 dividiendo la densitometría de PRR12 de cada muestra contra el promedio de la densitometría de actina y tubulina de la misma muestra.

Teniendo los valores de densitometría, las muestras de cerebro fueron comparadas entre sí, tomando el promedio de todos los embriones, neonatos y adultos, así como sus desviaciones estándar, utilizando el software Excel de Microsoft Windows y el software SPSS v15 para determinar diferencias estadísticamente significativas mediante ANOVA (nivel de significancia estadística de $P \leq 0.05$).

7.6 Inhibición de *PRR12* en la línea celular C6 de glioblastoma de rata.

Para la inhibición de *PRR12* se realizó una transfección reversa utilizando 3 ARNi prediseñados (Silencer Select, Ambion) contra el exón 5 (ID: s167567), exón 6 (ID: s167566) y exón 14 (ID: s167565) de *PRR12* basados en la secuencia XM_008759481.1 (NCBI) de la isoforma predicha X2 de *PRR12*, aunque todos los ARNi hibridan también con la isoforma predicha X1 de *PRR12* (XM_001080668.5) (NCBI), con las siguientes secuencias (Tabla 2):

Tabla 2. Secuencias de los ARNi Silencer Select, contra los exones 5,6 y 14 de *PRR12*.

ARNi anti exón 5:	Sentido: 5'-CCACUGCUUACGAUCCCUATT-3' Antisentido: 5'-UAGGGAUCGUAAGCAGUGGGA-3'
ARNi anti exón 6:	Sentido: 5'-GCAAGCGACUGGACGAAGATT-3' Antisentido: 5'-UCUUCGUCCAGUCGCUUGCAG-3'
ARNi anti exón 14:	Sentido: 5'-CUACAAAUACCACACGUUUTT-3' Antisentido: 5'-AAACGUGUGGUAAUUUGUAGTG-3'

Para el procedimiento, se tomaron 2 cultivos celulares independientes de la línea celular C6 de glioblastoma de rata, cultivados de la forma descrita en el anexo I, en medio Advanced DMEM suplementado, en condiciones de 37°C y 5% de CO₂ en incubadora (NuAire), crecidas en botellas de cultivo (Nunc), y recolectadas a una confluencia de alrededor del 90%. Para esto las células fueron tripsinizadas con 5mL de tripsina/EDTA (0.25%, Gibco) y recolectadas en 2 tubos de 15mL (Corning), fueron centrifugadas a 2500 xg (Centrifuga IEC

CL30R, Thermo) por 5min, a temperatura ambiente, y el sobrenadante fue decantado, posterior a esto se realizaron 2 lavados de las células utilizando el medio de cultivo para eliminar los rastros de tripsina.

Las células fueron resuspendidas en 4mL de medio de cultivo y se realizó su conteo mediante cámara de Neubauer, utilizando azul de tripano para evaluar la viabilidad celular (relación 1:6:1 de suspensión celular, medio de cultivo sin células y azul de tripano) contando las células en los 4 cuadrantes de conteo de glóbulos blancos. Se obtuvo el promedio y se multiplicó por el factor de dilución (x8) y por el factor de la cámara de Neubauer (x10,000), para obtener el número de células por mililitro de la suspensión celular.

Seguido de esto, se realizó la lipotransfección de las células, utilizando siPORT NeoFX (Ambion) como agente lipofectante (1µL por reacción), formando los complejos de ARNi-liposomas y sembrando en placas de 24 pozos (Nunc) con el equivalente a 40,000 células por pozo, utilizando el protocolo recomendado por el fabricante del siPORT NeoFX (Anexo II), con una concentración final de ARNi de 5nM, cambiando el medio de cultivo a las 24h y recolectando las células a las 24h y 48h.

Para la recolección, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 500µL de solución de lisis QIAzol (QIAGEN), pipeteando vigorosamente para lisar rápidamente todas las células y mantener el ARN en las mejores condiciones. Posteriormente se recolectaron los 500µL de cada pozo con muestra en tubos

de 2mL (SSI) y se añadieron otros 500µL de QIAzol (QIAGEN) a la placa de 24 pozos, volviendo a recolectarlos en el mismo tubo, para obtener la mayor cantidad posible de ARN total, seguido de vortex (Thermolyne) a máxima potencia por 30s a cada muestra, para asegurar la lisis total de las células, todo realizado en condiciones de esterilidad en campana de flujo LV-120 (Lumistell).

7.7 Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total a partir del lisado celular en buffer QIAzol (QIAGEN) de las células inhibidas y los hemisferios izquierdos de los cerebros de rata en sus diferentes etapas, extrayendo ARN total de 3 hemisferios derechos de cerebro de rata embrionaria, 3 de rata neonata y 3 de rata adulta. Todas las muestras fueron procesadas mediante el RNeasy lipid tissue mini kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante (Ver anexo III), utilizando centrífuga refrigerada y minicentrífuga (Eppendorf) a temperatura ambiente, eluyendo al final del proceso con 45µL de agua libre de nucleasas en el caso de los hemisferios cerebrales, y con 25µL en el caso de las células C6 transfectadas.

Para la extracción de los hemisferios completos, estos fueron homogeneizados mecánicamente mediante un homogeneizador vidrio-vidrio con 1mL de buffer de lisis QIAzol (QIAGEN) cada uno, y se guardaron en tubos de 2mL (SSI), agitando en vortex a máxima potencia por 30s cada muestra, para asegurar lisis

completa del tejido. En el caso de los cerebros adultos, al ser mucho más grandes y pesados, a partir de su homogeneizado total se tomaron 100µL y se diluyeron en 1mL más de QIAzol para la extracción de su ARN total.

Posterior al proceso de extracción, todas las muestras de ARN total fueron cuantificadas mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se evaluó su integridad mediante gel de agarosa (UltraPure, Invitrogen) al 2%, en cámara de electroforesis (Mini-Sub cell GT, Bio-Rad), corriendo a 90v (Fuente de poder PowerPac basic, Bio-Rad) por aproximadamente 90min, en gel previamente teñido con SYBR Safe (Invitrogen) y observado en el fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad), con el software Image Lab, antes de proceder a su retrotranscripción. Todas las muestras de ARN total se mantuvieron a -80°C en congelador vertical (So-Low) hasta su utilización.

7.8 Retrotranscripción

Se realizó la retrotranscripción de ARN total a ADNc a partir de 1µg de ARN de cada una de las muestras, utilizando la enzima retrotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Anexo IV) en un volumen final de 20µL, utilizando el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies) para todos los pasos de temperatura. La concentración resultante se evaluó mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y la

integridad mediante gel de agarosa al 2% en cámara de electroforesis, corriendo a 90v por aproximadamente 90min. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C en congelador (Torrey), hasta su utilización.

7.9 PCR punto final

Para comprobar la correcta amplificación de los primers y el ADNc obtenido, se realizó con cada una de las muestras una PCR punto final en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies), utilizando el siguiente par de primers:

P.F. 5'-TGACCTCCTGCTCTTCTTACT-3'

P.R. 5'-GTTGCTGTTGGGTTTCGTTTG-3'

Los cuales fueron diseñados con el programa Oligo 7 a partir de las secuencias de las isoformas predichas X1 (XM_001080668.5) y X2 (XM_008759481.1) de NCBI, de forma que los primers hibridaran en ambas isoformas predichas en el exón 14, con una T_m aproximada de 55°C, y amplificaran un fragmento de 89pb.

Para la reacción de PCR punto final se utilizaron las concentraciones finales de reactivos recomendadas por el fabricante de la SuperScript III (Invitrogen), en un volumen total de 50µL (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de reactivos que se utilizaron para la PCR PF.

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración final</i>
Buffer PCR	1x
MgCl ₂	1.5mM
dNTP's	0.2mM
Primers	0.2μM
Taq polimerasa	0.04U
ADNc	2μL
Agua	c.b.p. 50μL

Se utilizó el siguiente programa de temperaturas para lograr la amplificación del fragmento (Tabla 4):

Tabla 4. Pasos de temperatura para PCR PF.

<i>Paso</i>		<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1	Desnaturalización inicial	95°C	3min
2	Desnaturalización	94°C	30s
3	Alineamiento	60°C	45s
4	Extensión	72°C	60s
Repetir del paso 2 al paso 4, 40 veces.			
5	Extensión final	72°C	10min

Una vez terminados los pasos de amplificación, los productos amplificados se cargaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2% en cámara de electroforesis a 90v, por aproximadamente 90min, junto con un marcador de peso de 100pb a 1500pb (Invitrogen) para comprobar el tamaño del fragmento amplificado por los primers.

7.10 PCR tiempo real

Comprobada la correcta amplificación del fragmento deseado de *PRR12* a partir del ADNc de las muestras de células inhibidas y cerebro de las diferentes etapas, se procedió a la cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de *PRR12* utilizando los primers antes mencionados, para lo cual se realizaron en primer lugar 2 curvas estándar de 5 puntos, por duplicado, con 5 concentraciones de ADNc a partir de una de las muestras de rata neonata (1000ng, 200ng, 40ng, 8ng, 1.6ng), una curva para *PRR12* y otra para *GAPDH* como control endógeno.

Para esto, a partir de la muestra se realizó una dilución seriada de los 1000ng a los 1.6ng, con el fin de determinar la eficiencia de amplificación de los primers, permitiendo usar el análisis de curva estándar o pfaffl, así como la cantidad óptima de ADNc para la amplificación.

Para la amplificación de *GAPDH* como control endógeno, se utilizaron los primers prediseñados PrimeTime qPCR (IDT) (Rn.PT.39a.11180736.g), los cuales hibridan en el exón 1 del ARNm de *GAPDH* de rata según la secuencia de referencia NM_017008 (NCBI), y amplifican un fragmento de 165pb.

Secuencia primers *GAPDH*:

P.F. 5'-CCAGTAGACTCCACGACATAC-3'

P.R. 5'-AACCCATCACCATCTTCCAG-3'

Para la amplificación se utilizó el equipo 7500 Fast (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones de reacción (Tabla 5):

Tabla 5. Concentraciones de reactivos que se utilizaron para la qPCR.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
SYBR GreenER 2x	10 μ L
Primer Forward 10 μ M	1 μ L
Primer Reverse 10 μ M	1 μ L
ADNc	Equiv. 1000, 200, 40, 8, 1.6ng
Agua	c.b.p 20 μ L

Utilizando las siguientes condiciones de temperatura (Tabla 6):

Tabla 6. Pasos de temperatura utilizados para la qPCR.

<i>Paso</i>		<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1	Activación de la Taq	50°C	2min
2	Desnaturalización inicial	95°C	10min
3	Desnaturalización	95°C	15s
4	Extensión	60°C	60s
Repetir del paso 2 al paso 4, 40 veces			

Una vez obtenida la curva estándar de *PRR12* y *GAPDH* se tomó el umbral (threshold) determinado automáticamente por el software propio del equipo y se determinó la eficiencia de los primers graficando una curva de calibración de Ct vs Log₁₀ [ADNc], obteniendo la ecuación de la recta, para posteriormente usar la pendiente de la misma para la determinación de la eficiencia con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{\frac{-1}{m}}$$

Para considerar que nuestros primers poseen una buena eficiencia de amplificación en las condiciones establecidas, la eficiencia tiene que ser lo más cercana posible a 2, lo cual indica que por cada ciclo de temperaturas la cantidad de ADNc se duplica.

Para el análisis de la expresión diferencial de los cerebros de rata en sus diferentes etapas, se realizó una dilución de todas las muestras a un volumen de 20µL a concentración de 50ng/µL y de cada dilución se utilizó el equivalente a 100ng (2µL) para la reacción de amplificación en el equipo 7500 Fast (Applied Biosystems), utilizando los primers para *PRR12* y *GAPDH* como gen endógeno (Tabla 7).

Tabla 7. Concentraciones de reactivos utilizados para la qPCR. Muestras de cerebros.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad por reacción</i>
SYBR GreenER 2x	10µL
Primer Forward 10µM	1µL
Primer Reverse 10µM	1µL
ADNc	Equiv. 100ng
Agua	c.b.p 20µL

Para el análisis de inhibición de *PRR12*, se diluyeron las muestras a un volumen de 20µL a una concentración de 100ng/µL, utilizando una mayor concentración de ADNc para poder apreciar de mejor forma la inhibición, y de cada dilución se utilizó el equivalente a 200ng (2µL) para la reacción de amplificación, utilizando *GAPDH* como gen endógeno (Tabla 8).

Tabla 8. Concentraciones de reactivos utilizados para la qPCR. Células transfectadas.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
SYBR GreenER 2x	10µL
Primer Forward 10µM	1µL
Primer Reverse 10µM	1µL
ADNc	Equiv. 200ng
Agua	c.b.p 20µL

Se obtuvieron las gráficas de amplificación y los Ct utilizando el umbral determinado por el software, posterior a esto se compararon los ΔCt de las muestras de cerebro utilizando el software Excel (Microsoft Office) y se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa mediante el software SPSS, usando el análisis estadístico de Kruskal Wallis y “U” de Mann Whitney, tomando como estadísticamente significativo una $P \leq 0.05$.

Para obtener el porcentaje de inhibición de *PRR12* en las células C6 de glioblastoma de rata, se obtuvieron los Ct de las muestras transfectadas con el ARNi, muestras transfectadas con el control negativo y muestras sin transfectar y se compararon mediante el software Excel (Microsoft Office) y el software REST 2009 para determinar la inhibición.

7.11 Microarreglo de expresión

Una vez comprobada la inhibición de *PRR12* en la línea celular C6 de glioblastoma de rata, se procedió a realizar el microarreglo de expresión con el

modelo de 2 colores y la técnica de Dye-Swap (marcaje cruzado), con el fin de determinar los genes, vías de señalización y procesos biológicos que se ven alterados por la disminución en la expresión de la proteína PRR12 en esta línea celular.

Para esto, a las 4 muestras con mayor inhibición (anti exón 6 A y B a las 48h, y anti exón 14 A y B a las 48h) y el ARN de las células transfectadas con el control negativo (Silencer negative control #1, Ambion), se realizó su procesamiento según el protocolo sugerido por Agilent Technologies (Anexo V), con el Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies), para lo cual se realizó su retrotranscripción a ADNc, y su retrotranscripción a ARNc quedando marcadas las cadenas de ARNc con los marcadores fluorescentes Cyanine 3 (Cy3 Rojo) y Cyanine 5 (Cy5 Azul), cada muestra y control marcada con ambos colores, de forma que se pudiese utilizar la técnica de Dye-Swap (Figura 7), la cual permite la eliminación de falsos positivos debidos a errores o sesgo en el marcaje de las cadenas de ARNc con uno u otro color.

Exon6ACy3 Ctrl(-)ACy5	Exon6BCy3 Ctrl(-)BCy5	Exon14ACy3 Ctrl(-)ACy5	Exon14BCy3 Ctrl(-)BCy5
Exon6ACy5 Ctrl(-)ACy3	Exon6BCy5 Ctrl(-)BCy3	Exon14ACy5 Ctrl(-)ACy3	Exon14BCy5 Ctrl(-)BCy3

Figura 7. Diagrama de la hibridación de las muestras en el microarreglo, utilizando la técnica Dye-Swap.

Posteriormente el ARNc se purificó, fragmentó y se hibridó en un microarreglo de expresión de rata de 8 muestras y 60,000 sondas por muestra (SurePrint G3 Rat GE 8x60K, Agilent Technologies), incubando en horno rotatorio (Shel Lab) a 65°C por 17h.

Después de la hibridación del microarreglo, se procedió a su lavado y su escaneo con la plataforma SureScan (Agilent Technologies), obteniendo una imagen en blanco y negro con el mapa de puntos del microarreglo, posterior a esto, la imagen se procesó con el software Agilent Feature Extraction, mediante el cual se obtuvo la imagen a color de los spots del microarreglo, obteniendo también el análisis de control de calidad de cada uno de los campos, y los archivos “.TXT” que indican el valor numérico de la intensidad de cada sonda, los cuales fueron procesados con un demo del software GeneSpring (con Pathways analysis), con todas las actualizaciones posibles, con el cual se realizó el análisis de significancia biológica.

Para esto, en primer lugar se realizó el análisis de componente principal, que permite observar la tendencia de las muestras a agregarse según sus similitudes. Posteriormente se eliminaron del análisis todas las sondas que pudiesen estar comprometidas, y se filtraron solo aquellas sondas que pasaron el análisis de significancia, el cual se realizó mediante una prueba T de Student entre las mismas muestras marcadas con Cy3 y Cy5, tomando solo aquellas sondas con una significancia $P \leq 0.01$.

Después se tomaron en cuenta para el análisis sólo aquellas sondas con un cambio en su nivel de expresión (Fold change) mayor a 2, lo que significa que solo se consideraron aquellas sondas con una expresión de al menos el doble o la mitad de los controles, obteniendo los genes encontrados como sobre-expresados o sub-expresados en el análisis.

Con las sondas no comprometidas, que pasaron el análisis de significancia y que se encontraban con un cambio significativo en su nivel de expresión, se procedió a obtener los procesos biológicos alterados según GeneOntology (GO), tomando solo aquellos procesos con una significancia $P \leq 0.01$. Una vez determinados los procesos biológicos afectados, se procedió a obtener las vías de señalización que se veían afectadas tras la inhibición de *PRR12*, utilizando la herramienta de WikiPathways.

Capítulo VIII

RESULTADOS

8.1 Obtención de cerebros

Se obtuvieron 8 cerebros de rata embrionaria, 14 cerebros de rata neonata y 4 cerebros de rata adulta (26 cerebros totales), los cuales fueron seccionados longitudinalmente, de modo que se obtuvieron los hemisferios izquierdos y derechos de cada cerebro, siendo procesados los hemisferios izquierdos para obtención de ARN total y los derechos para obtención de proteínas.

8.2 Obtención y cuantificación de proteínas totales

Las 28 muestras de hemisferio derecho, así como las muestras de cultivo celular de la línea C6 de glioblastoma de rata fueron homogeneizadas en TBS con inhibidores de proteasas, y se realizó su cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford en placas de 96 pozos (Figura 8), comparándolas contra una curva de calibración de albumina realizada en cada placa con muestras, con concentraciones de albumina de los 0.5µg a los 5µg, realizando una curva para muestras del cultivo celular C6 de glioblastoma (Figura 9), una para los cerebros de rata embrionaria y adulta (Figura 10) y otra más para las muestras de rata neonata (Figura 11).

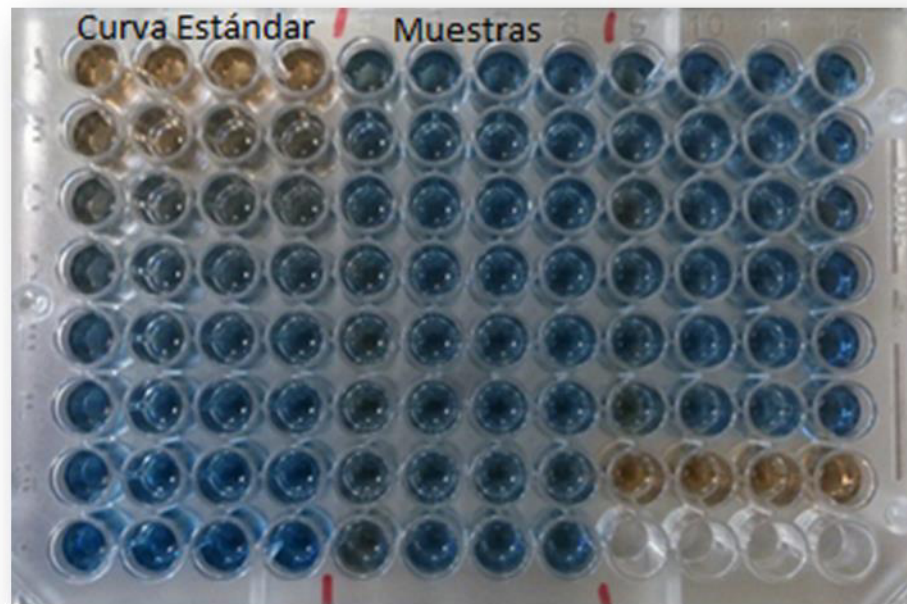


Figura 8. Ejemplo de placa de 96 pozos para cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

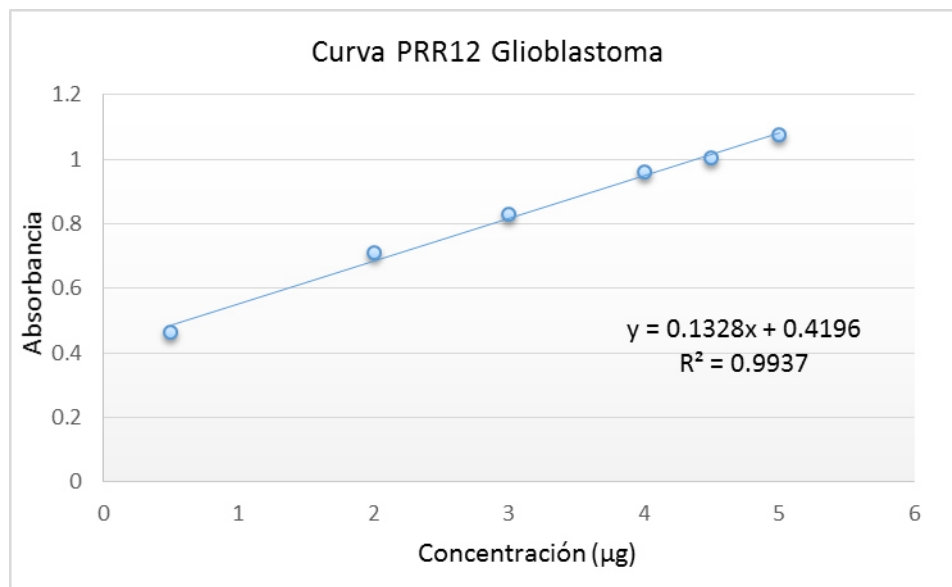


Figura 9. Curva de calibración, para muestras de la línea celular C6.

Se cuantificaron las proteínas totales de 2 cultivos celulares independientes de la línea celular C6 de glioblastoma de rata (A y B), y se determinó una concentración promedio de $1.707 \pm 0.18 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas totales.

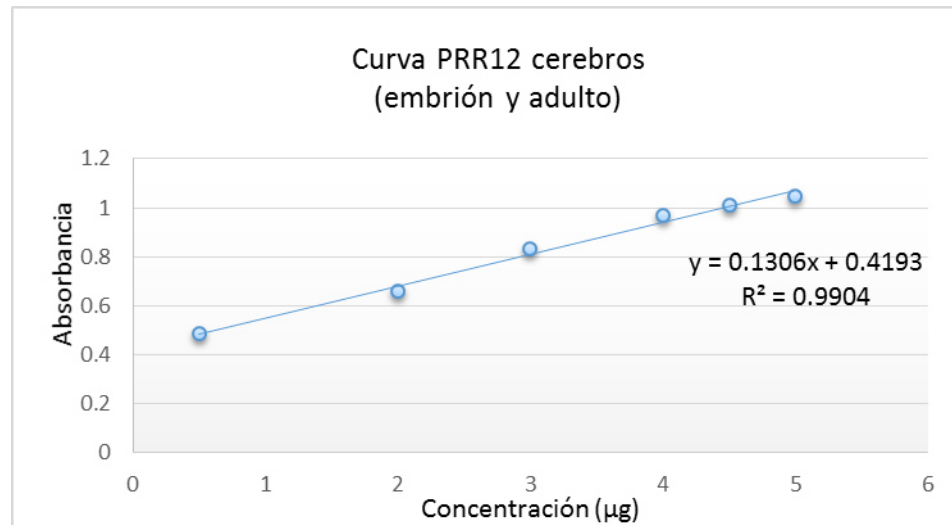


Figura 10. Curva de calibración, para cerebros de rata embrión y adulta.

En cuanto a la cuantificación de proteínas totales de los hemisferios derechos de los cerebros de rata en sus etapas neonatal y adulta, ambos fueron medidos en la misma placa, obteniendo una concentración promedio de $3.662 \pm 1.08 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en el caso de los embriones, y $34.147 \pm 7.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en los adultos.

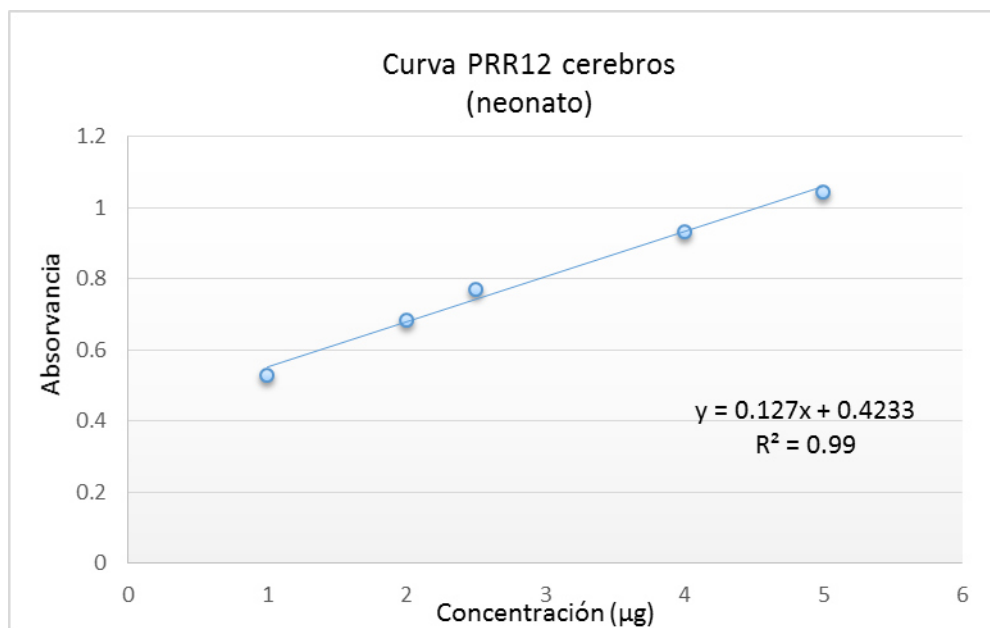


Figura 11. Curva de calibración, para cerebros de rata neonata.

La cuantificación de proteínas totales de los hemisferios derechos de cerebro de rata neonata dio como resultado una concentración promedio de $14.538 \pm 1.69 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Se determinó la concentración proteica total de los homogeneizados de hemisferio derecho de las diferentes etapas del desarrollo de rata, obteniendo concentraciones similares en las muestras de cada etapa, correlacionándose la concentración obtenida, con el tamaño relativo de los cerebros en cada etapa.

8.3 Western blot

Se realizaron Western blots a partir tanto del homogeneizado de la línea celular C6 de glioblastoma de rata (Figura 12), como de las muestras de hemisferio derecho de los cerebros de rata de diferentes etapas (embrión (6 muestras), neonato (6 muestras) y adulto (4 muestras)) (Figura 13), utilizando 50µg totales de la proteína previamente cuantificada, las cuales se corrieron en un gel de acrilamida al 6%, en condiciones desnaturalizantes, y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, para posteriormente ser incubados con anticuerpo anti-PRR12. En el caso de las muestras de cerebro, también se incubaron con anticuerpo anti-actina y anti-tubulina, como controles de carga, para la determinación de expresión relativa de la proteína PRR12.

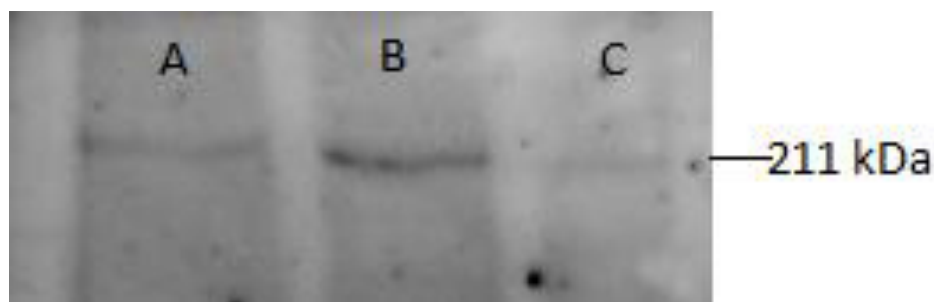


Figura 12. Western blot de la línea celular C6 de glioblastoma de rata. A y B corresponden a las 2 muestras procesadas de glioblastoma. C control positivo (Neuroblastoma).

Se realizó el western blot de PRR12 en la línea C6 de glioblastoma de rata, con el fin de determinar si esta línea celular podía ser utilizada como modelo experimental para la inhibición de *PRR12*, encontrando que estas células si expresan PRR12, aún a concentraciones mas altas que el control positivo

(neuroblastoma), lo cual permite su utilización, así como una mejor detección de la inhibición de *PRR12*, comparada con la línea celular de neuroblastoma, debido a que si la expresión de *PRR12* es muy baja, es posible que no se evidencie claramente un cambio en los análisis.

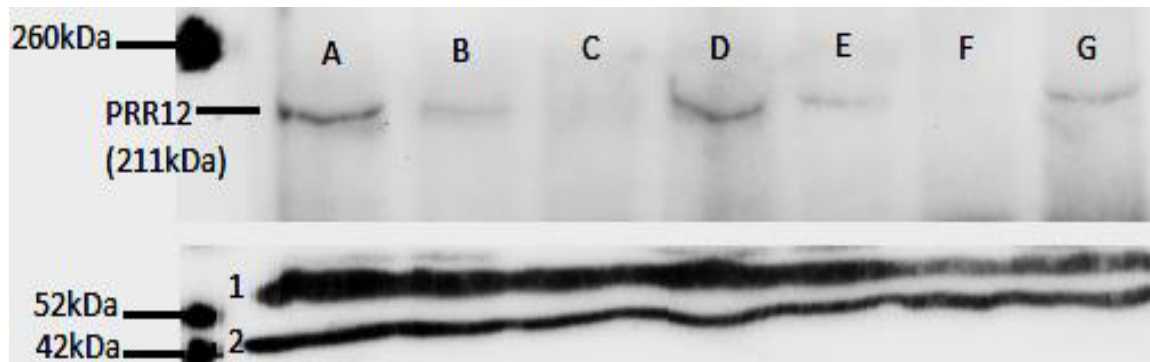


Figura 13. Western blot de las muestras de cerebro de rata en sus diferentes etapas. A, D y G embriones. B y E neonatos. C y F adultos. 1 Tubulina (55kDa). 2 Actina (42kDa).

El western blot de los cerebros de rata en sus diferentes etapas, muestra de forma evidente una tendencia hacia una mayor expresión de la proteína *PRR12* en etapas tempranas del desarrollo, especialmente en la etapa embrionaria, donde ocurre en su mayor parte el neurodesarrollo.

A partir de los western blots realizados con los cerebros de rata, se realizó su densitometría (figura 14), para obtener los datos de una forma cuantitativa, y poder realizar los análisis para determinar si realmente existe una diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes etapas.

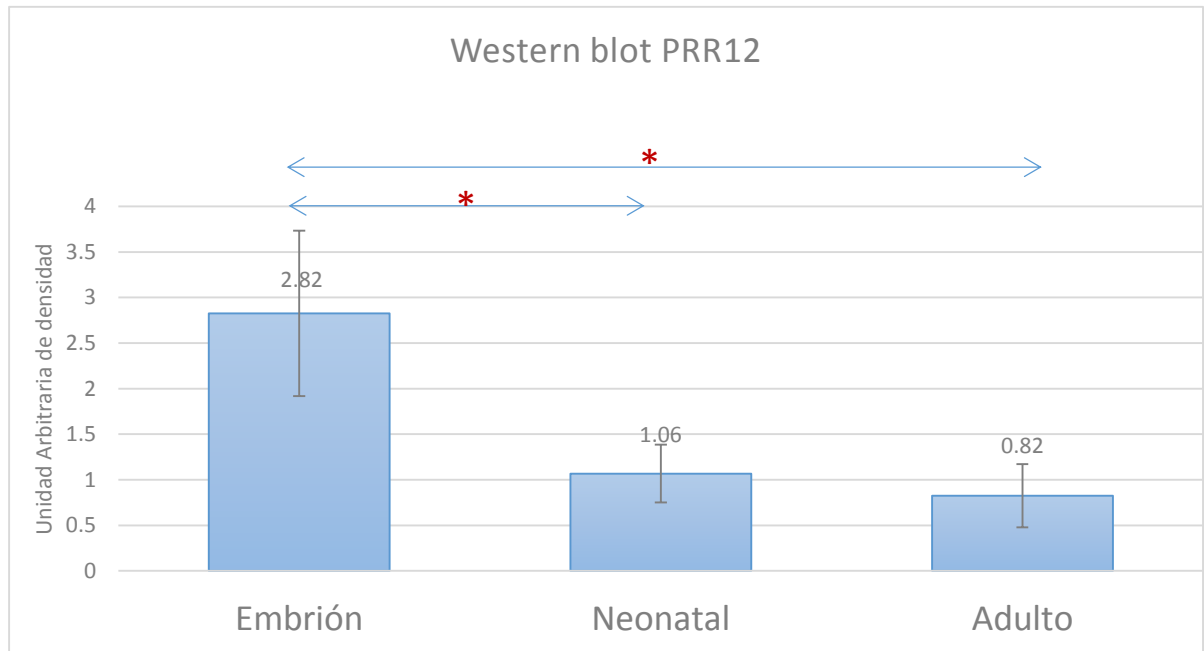


Figura 14. Comparación de la densitometría de los cerebros de rata en sus diferentes etapas de desarrollo, con diferencia estadísticamente significativa entre embrión y neonatal, y embrión y adulto (ANOVA).

La gráfica resultante de la comparación de las etapas, muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, encontrándose el embrión, con alrededor de 3 veces mayor concentración de PRR12 que los otros grupos, lo cual señala que *PRR12* tiene un posible papel importante en el desarrollo del sistema nervioso.

8.4. PCR tiempo real

Además de la evaluación de la proteína PRR12 en las diferentes etapas del desarrollo mediante Western blot, también se evaluó su nivel de expresión (ARNm) mediante qPCR (3 muestras de embrión, 3 de neonato y 3 de adulto), extrayendo el ARN total de los hemisferios izquierdos recolectados anteriormente, realizando su retrotranscripción y comprobando su correcta amplificación y tamaño de fragmento (89pb) mediante PCR punto final (Figura 15), con un par de primers diseñados para la qPCR, los cuales hibridan en todas las isoformas del ARNm.

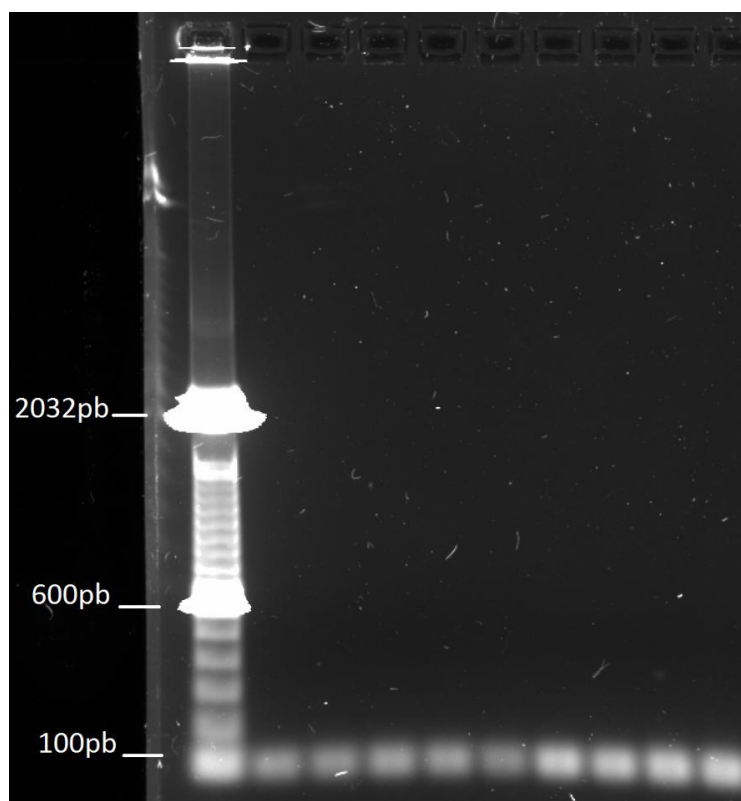


Figura 15. PCR punto final, donde se muestra la amplificación de todas las muestras alrededor del peso esperado para el fragmento que fueron diseñados los primers (89pb), bajo las condiciones de la qPCR ($T_m=60^{\circ}\text{C}$).

Mediante la PCR punto final, se pudo determinar que los primers diseñados para la qPCR, amplifican adecuadamente a las condiciones predeterminadas para la PCR tiempo real (T_m : 60°C), sin formación aparente de dímeros de primers o amplificaciones inespecíficas, obteniendo un fragmento del tamaño esperado.

Para la qPCR, se realizó en primer lugar una curva de calibración con diferentes cantidades del ADNc obtenido, tanto de *PRR12* (Figura 16) como de *GAPDH* (Figura 17), para poder determinar la eficiencia de amplificación de los primers, así como la concentración de ADNc a usar para la determinación de la expresión diferencial.

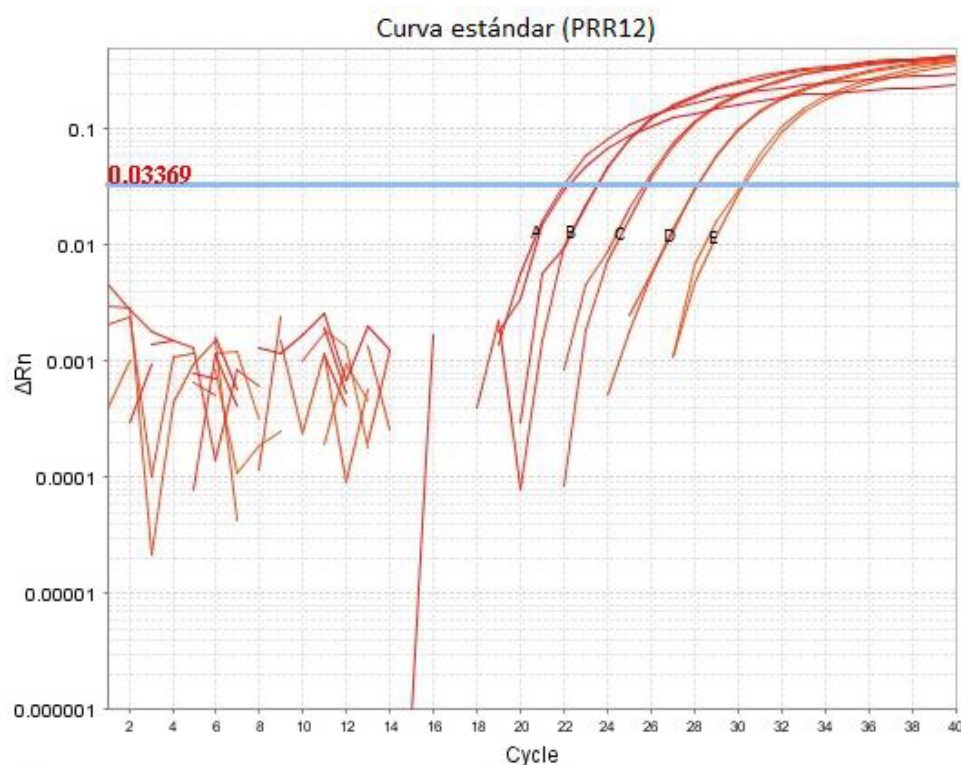


Figura 16. Curva estándar de concentraciones de ADNc para *PRR12*. A 1000ng. B 200ng. C 40ng. D 8ng. E 1.6ng.

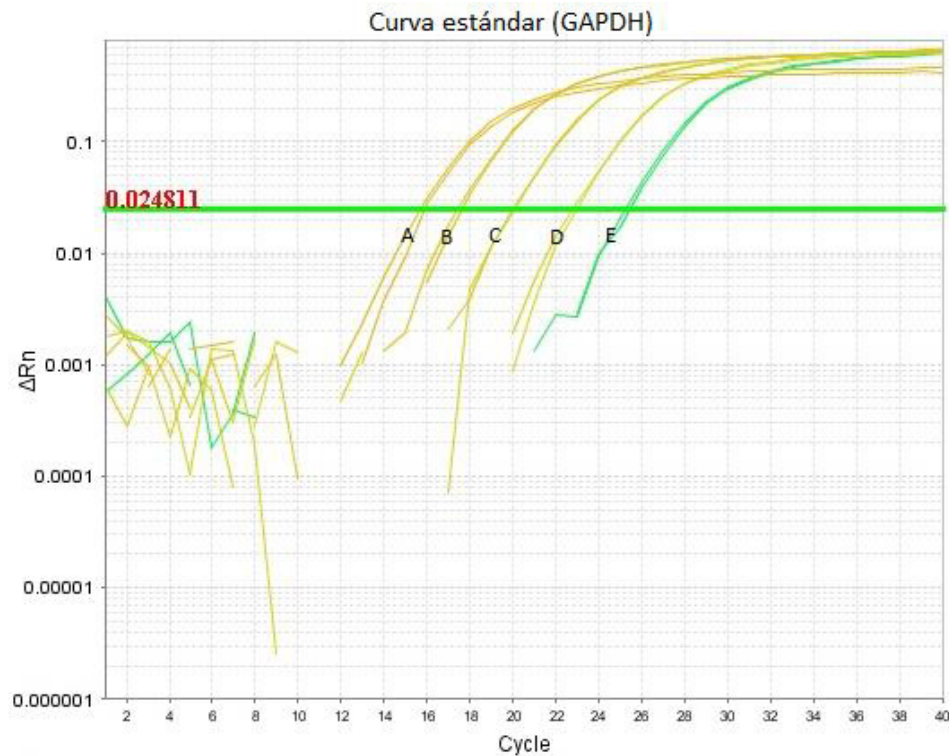


Figura 17. Curva estándar de concentraciones de ADNc para *GAPDH*. A 1000ng. B 200ng. C 40ng. D 8ng. E 1.6ng.

Obteniendo las curvas estándar de *PRR12* y *GAPDH*, se determinó la eficiencia de amplificación de los primers, siendo ésta de 2.1 para el par de primers que amplifican *PRR12* y 1.9 para el par de primers que amplifica el gen endógeno *GAPDH*.

Obtenida la eficiencia de los primers, conforme a la curva estándar, se determinó utilizar 100ng de cada muestra de ADNc de cerebro, para las siguientes pruebas de expresión diferencial. Además de esto, se observó la curva de fusión de *PRR12* (Figura 18) y no se encontraron amplificaciones

inespecíficas, ni dímeros de primers, por lo que se puede asegurar que los resultados obtenidos dependen solo de la amplificación de *PRR12*.

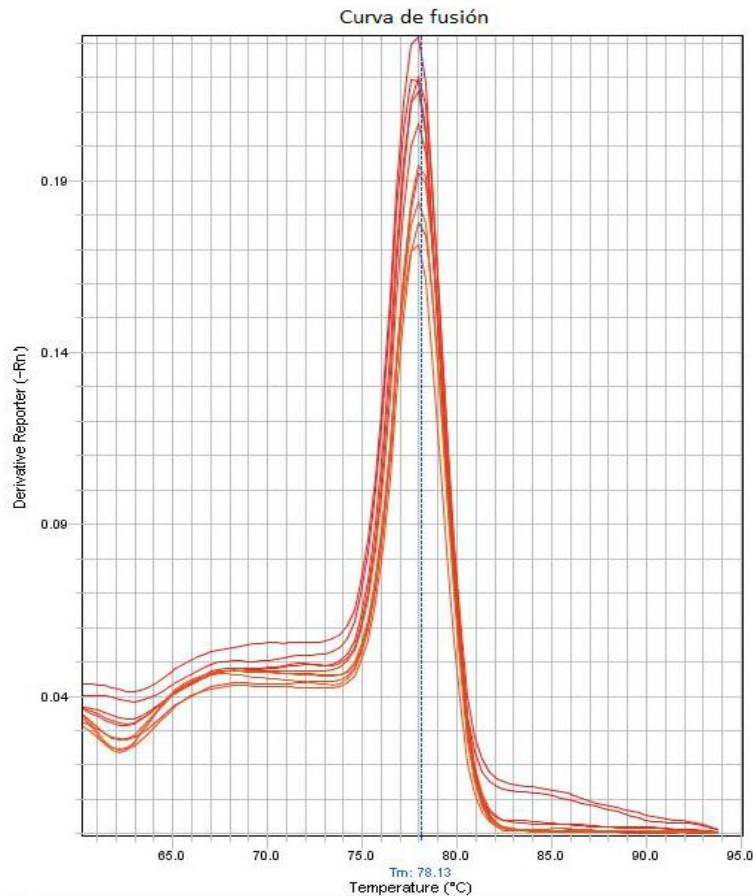


Figura 18. Curva de fusión de *PRR12*. No se observan amplificaciones inespecíficas.

Una vez verificada la correcta amplificación de los primers y la cantidad de muestra a utilizar, se procedió al análisis de la expresión diferencial de *PRR12* (Figura 19) y el gen endógeno *GAPDH* (Figura 20), en las muestras de hemisferio derecho de cerebro de rata en sus diferentes etapas (embrión, neonato y adulto).

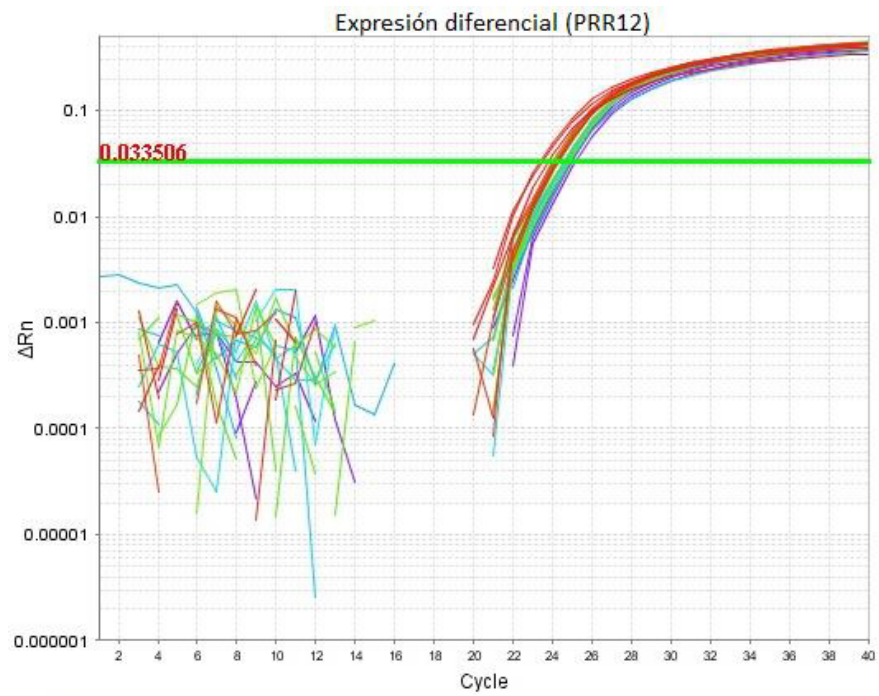


Figura 19. Expresión diferencial de *PRR12* en las muestras de cerebro.

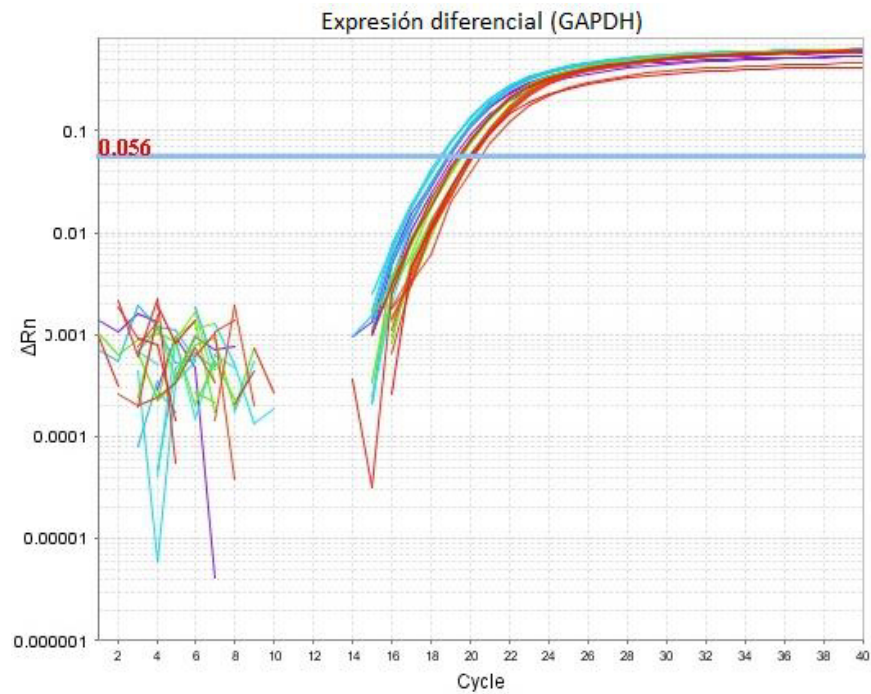


Figura 20. Expresión diferencial de *GAPDH* en las muestras de cerebro.

Mediante la comparación de los Ct de las diferentes muestras (Figura 21), se pudo analizar cuales muestras son las que mas expresan el ARNm de *PRR12*, así como determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

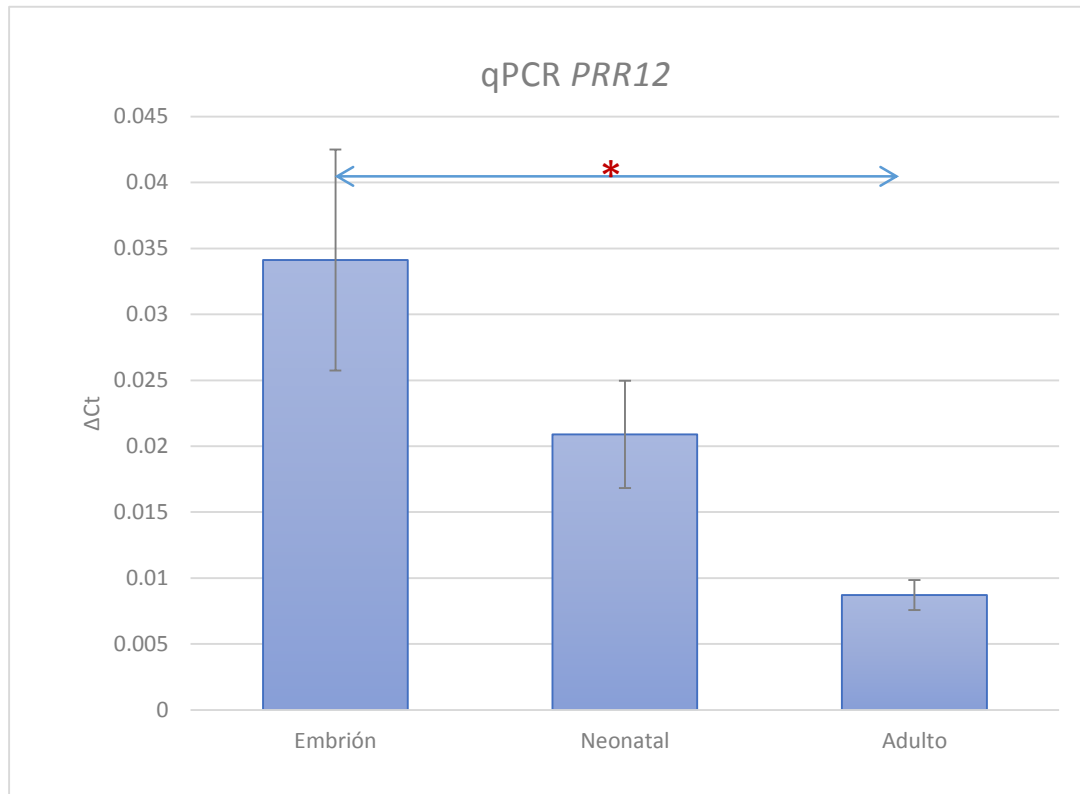


Figura 21. Comparación de la expresión de ARNm de los cerebros de rata en sus diferentes etapas de desarrollo, con diferencia estadísticamente significativa entre embrión y adulto (Kruskal Wallis).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras de embrión y las muestras de adulto, con una tendencia de *PRR12* a ir disminuyendo su expresión conforme etapas mas avanzadas del desarrollo, estos datos se correlacionan con los obtenidos en Western blot, donde tambien existe una mayor expresión en los embriones de rata.

8.5 Inhibición de *PRR12* en la línea celular C6 de glioblastoma de rata

Para determinar los procesos biológicos, vías de señalización y genes que se ven afectados tras la inhibición de *PRR12*, se realizó la inhibición de su ARNm mediante 3 diferentes ARNi en la línea celular C6 de glioblastoma de rata, comprobando en primer lugar su inhibición mediante qPCR, para lo cual se midió la expresión diferencial de *PRR12* en cultivos transfectados con el ARNi y cultivos transfectados con un control negativo, así como contra cultivos sin transfectar, a las 24h (Figura 22) y a las 48h (Figura 23) utilizando de la misma forma *GAPDH* como gen endógeno.

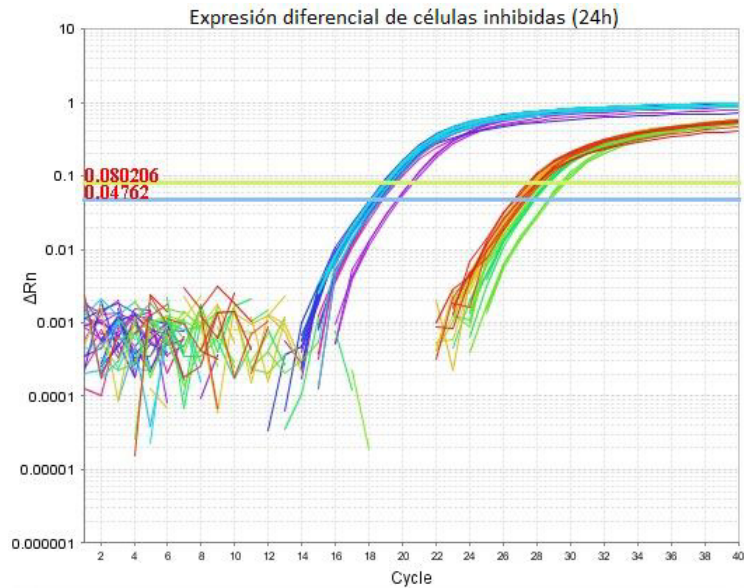


Figura 22. Expresión diferencial de las células C6 de glioblastoma de rata, inhibida con ARNi contra *PRR12* (24h).

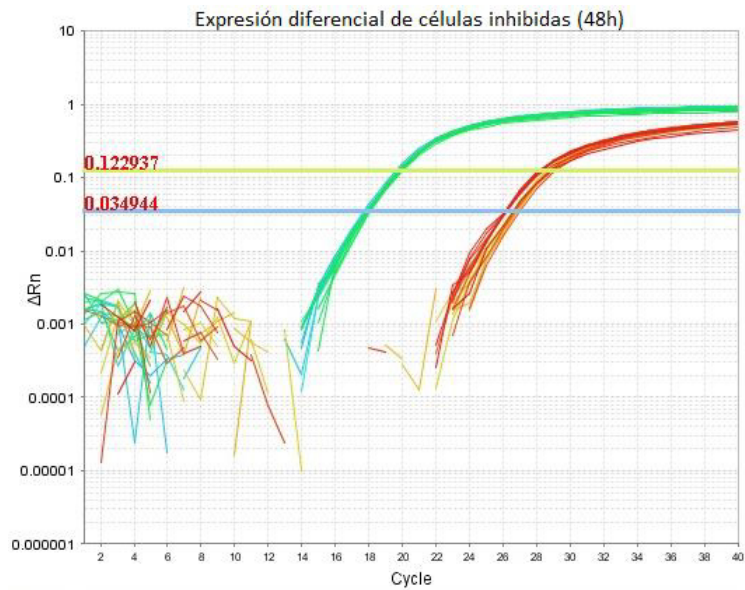


Figura 23. Expresión diferencial de las células C6 de glioblastoma de rata, inhibidas con ARNi contra *PRR12* (48h).

Comparando los Ct de las células inhibidas y sin inhibir (Figura 24), se determinó que realmente hubo una inhibición en la expresión de *PRR12*.

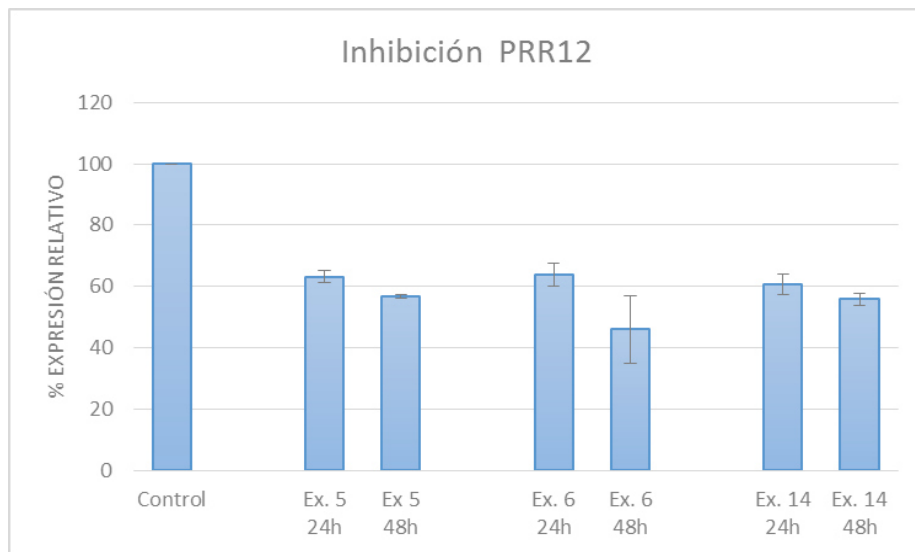


Figura 24. Inhibición de la expresión del ARNm de *PRR12* de los anti-exón 5, 6 y 14. A las 24 y 48h.

Mediante la transfección de los diferentes ARNi en estas condiciones, se logró obtener una inhibición de entre el 30 y 60%, encontrándose una mayor inhibición a las 48h, especialmente en el ARNi contra el exón 6, por lo que se procedió a utilizar el duplicado de células transfectadas con el anti-exón 6, y el duplicado de células transfectadas con el segundo ARNi que más obtuvo inhibición, siendo éste el anti-exón 14, además de las células transfectadas con el control negativo.

Se realizó una observación de la morfología celular de la línea C6, con el fin de evaluar si existían cambios en la misma, tras la inhibición (Figura 25).

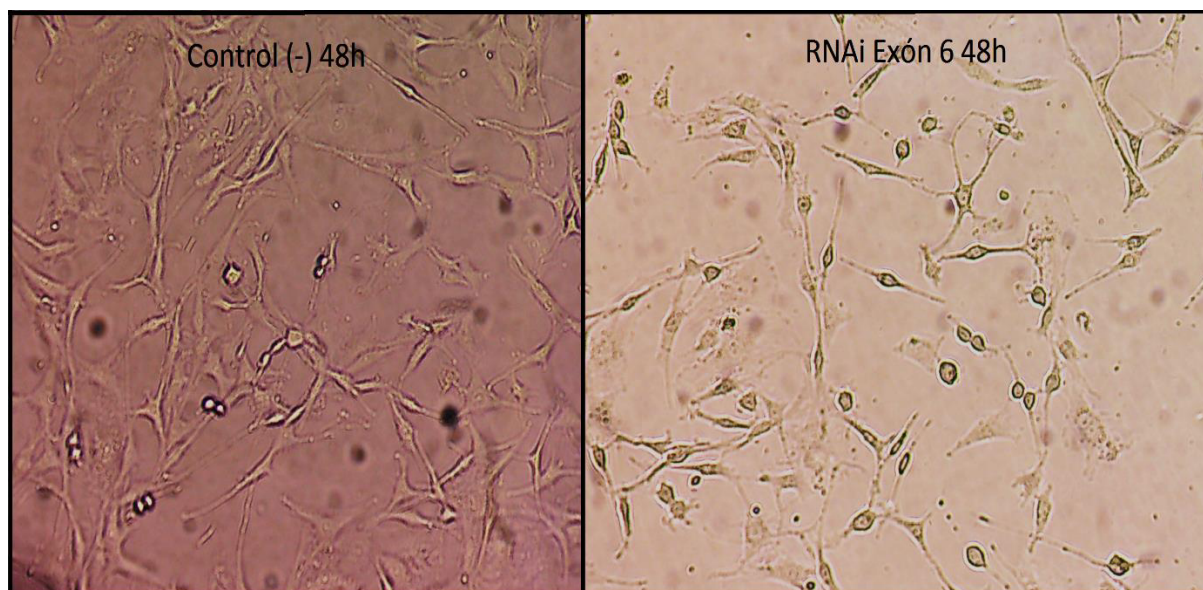


Figura 25. Evaluación de los cambios morfológicos de la línea celular C6 de glioblastoma de rata. Células transfectadas con el control negativo vs células mayormente inhibidas (anti-exón 6 a las 48h).

No se observaron cambios morfológicos evidentes en la línea celular tras la inhibición de *PRR12*, salvo que las células parecen encontrarse un poco más redondeadas, comparadas con el control negativo.

8.6. Microarreglo de expresión

Una vez comprobada la inhibición del ARNm de *PRR12*, se procedió a evaluar los cambios en el perfil de expresión de las células C6 de glioblastoma de rata, al encontrarse inhibido *PRR12*, para esto, las 4 muestras mas inhibidas (anti exon-6 y anti exon-14) fueron procesadas por duplicado, cada una con un control de células transfectadas con el control negativo, y fueron hibridados en un microarreglo de expresión (Figura 26).

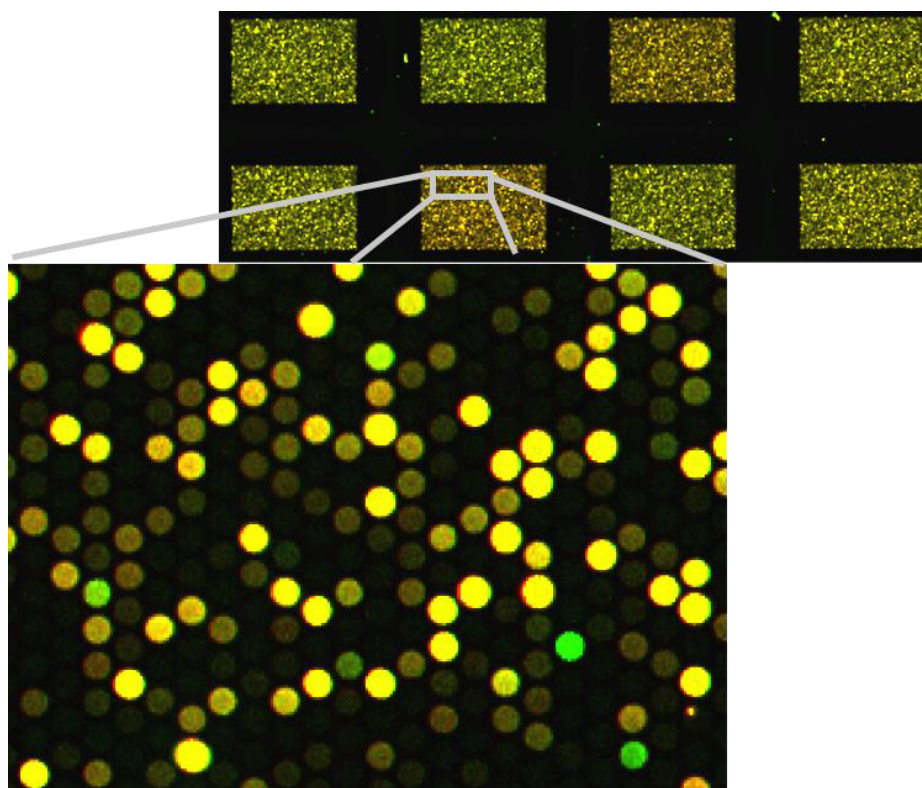


Figura 26. Imagen del microarreglo posterior a la hibridación de las muestras y escaneo.

Una vez escaneado el microarreglo, y aprobados los controles de calidad, los datos del perfil de expresión se obtuvieron mediante los softwares

correspondientes, realizando el flujo de trabajo de significancia biológica, el cual consiste en los siguientes pasos:

- Filtro de sondas: Eliminación de todas las sondas que pudiesen estar comprometidas en el microarreglo.
- Análisis de significancia: Se realizó un análisis de T de Student, en el cual se compararon entre sí los replicados de la misma muestra, y se eliminaron todas aquellas sondas que no cumplían con una significancia de al menos $P = 0.01$.
- Cambio de expresión: Solo se tomaron en cuenta aquellas entidades cuyo cambio en la expresión fue al menos de 2 (Figura 27).
- Análisis de procesos biológicos involucrados en GO: Se tomaron en cuenta solo aquellos procesos biológicos con una significancia de al menos $P = 0.01$.
- Análisis de vías de señalización involucradas (WikiPathways).

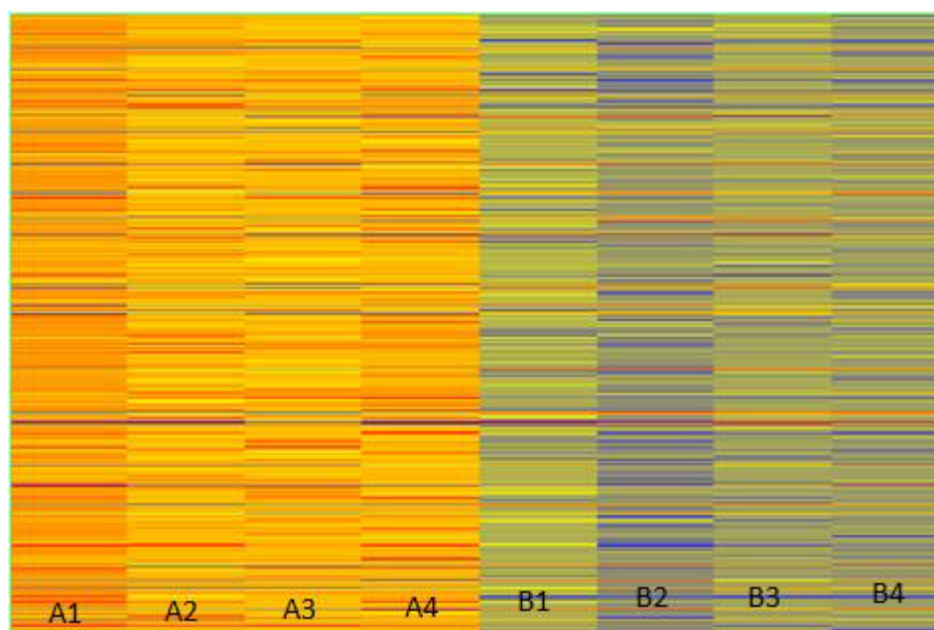


Figura 27. Mapa de calor mostrando la sobreexpresión y sub-expresión de múltiples genes, observándose el cambio debido a la técnica de Dye-Swap, donde las muestras se marcaron primero con Cy3 (A1-A4) y posteriormente con Cy5 (B1-B4).

Posterior al análisis de significancia biológica se obtuvieron aquellos genes encontrados como sub-expresados, genes sobre-expresados, procesos biológicos y vías de señalización involucradas.

En el microarreglo de expresión se encontraron sub-expresados 4874 genes, se encontraron sobre-expresados 393 genes, se obtuvieron 134 procesos biológicos significativos involucrados (GO) (Anexo VI), entre los que destacan aquellos en la tabla 9, y 16 vías de señalización significativas afectadas tras la inhibición de *PRR12* (WikiPathways) (Anexo VII y VIII), entre los que se destacan aquellos en la Tabla 10.

Tabla 9. Procesos biológicos que se vieron afectados tras la inhibición de *PRR12*.

Proceso	Significancia
Actividad de receptor	0.0
Transducción de señales	0.0
Percepción sensorial de estímulos químicos	0.0
Percepción sensorial de aromas	0.0
Señalización transmembranal de receptor	0.0
Procesos del sistema neurológico	0.0
Señalización de receptores acoplados a proteína G	0.0
Comunicación celular	0.0
Señalización célula-célula	3.95E-6
Transmisión sináptica	3.95E-4

Los procesos biológicos afectados tras su inhibición colocan a *PRR12* como parte importante de los procesos efectuados en la membrana celular, como los procesos de recepción de estímulos, tanto estímulos químicos (neurotransmisores) como estímulos iónicos (Ca, K), así también en el procesamiento de estas señales que llegan a la membrana de las células, involucrando a *PRR12* en múltiples procesos de comunicación celular, especialmente aquellos llevados a cabo por las células del sistema nervioso central.

Tabla 10. Vías de señalización que se vieron afectadas tras la inhibición de *PRR12*.

<i>Vías de señalización</i>	<i>Significancia</i>
Receptores tipo rodopsina acoplados a proteínas G	1.33E-24
Receptores peptídicos acoplados a proteína G	9.52E-10
Otros tipos de receptores acoplados a proteína G	2.43E-8
Receptores monoamínicos acoplados a proteína G	1.83E-5
Receptores de pequeños ligandos acoplados a proteína G	1.08E-2
Lesión de médula espinal	3.83E-2

Las vías de señalización más significativas son aquellas que involucran a los receptores de membrana acoplados a proteína G, los cuales sitúan también a *PRR12* en los procesos de recepción de estímulos en la membrana celular, encontrándose involucrado con un alto número de receptores, debido a la gran cantidad de receptores membranales que se encuentran acoplados a proteína G, la cual comienza una gran cascada de señalización dentro de la célula.

Comparando los datos obtenidos en el ensayo de inhibición con los datos de la paciente con la interrupción de *PRR12*, se encontraron 99 genes o familias de genes cuya alteración se encuentra compartida, algunos de los más importantes se encuentran en la tabla 11.

Además de una correlación entre algunas de las vías encontradas como afectadas en la paciente y en las células inhibidas, como lo son:

- Vía de señalización del factor neurotrófico derivado de cerebro.
- Receptores tipo rodopsina acoplados a proteínas G.
- Receptores monoamínicos acoplados a proteínas G.
- Otros receptores acoplados a proteínas G.

Tabla 11. Genes con importancia biológica encontrados como desregulados tanto en las células inhibidas como en la paciente afectada por la translocación que interrumpe *PRR12*.

<i>Gen</i>	<i>Proceso</i>
<i>CELSR1</i>	Adhesión celular e interacción con receptores de ligando.
<i>CPEB1</i>	Posible rol en proliferación celular.
<i>DISC1</i>	Extensión de neuritas y desarrollo del córtex.
<i>NRCAM</i>	Adhesión neuronal y señalamiento direccional del cono axonal.
<i>PTPRJ</i>	Regulación de crecimiento celular y diferenciación.
<i>PTPRO</i>	Inhibición de la proliferación celular.

Varios de los genes que se encontraron diferencialmente expresados tanto en la paciente, como en las células inhibidas, están involucrados en procesos patológicos cuando se encuentran alterados, además de estar altamente involucrados en el desarrollo del SNC, ya que se encuentran varios genes encargados de adhesión celular, extensión de neuritas, diferenciación celular y mecanismos de proliferación.

Capítulo IX

DISCUSIÓN

Para la correcta formación y funcionamiento del SNC, es necesaria la adecuada expresión y función de múltiples productos génicos, siendo uno de los sistemas más finamente regulados del organismo, y del cual no se han logrado esclarecer todos los mecanismos moleculares que lo rigen, así como tampoco determinar todos los productos proteicos que lo componen, ni la función de una gran cantidad de los que si se han detectado. De hecho, apenas hace unos 3 años, se describió por primera vez, que mutaciones en un grupo de genes relacionados con remodelación de la cromatina podían conducir a fenotipos de DI.

Estos factores de remodelación de la cromatina, regulan la expresión y acceso a genes mediante la alteración dinámica de la estructura de la cromatina. Por ejemplo, se ha identificado un set de genes autosómicos conservados evolutivamente que codifican para factores del complejo SWI/SNF, los cuales participan en la remodelación de la cromatina, para facilitar la expresión génica necesaria en el desarrollo neuronal y otros procesos celulares (no necesariamente neuronales)(Tsurusaki et al., 2012).

Debido a esto, y con el fin de conocer mejor los procesos normales y los potenciales mecanismos patogénicos en el SNC, es necesario el análisis

funcional de aquellos genes candidatos con posible actividad en SNC y por ende, a ser potenciales causantes de enfermedades neurológicas, tal es el caso del gen *PRR12*, recientemente descrito por nuestro grupo de trabajo como un candidato para participar como cofactor nuclear de transcripción involucrado en el neurodesarrollo y causar un fenotipo neuropsiquiátrico tras su alteración (Córdova et al., 2015). Un mayor conocimiento del proteoma del SNC, eventualmente permitirá encontrar alternativas terapéuticas/diagnósticas para múltiples enfermedades mentales.

En este estudio se realizó un modelo *in vitro* de inhibición de *PRR12* en la línea celular C6 de glioblastoma de rata para identificar potenciales genes y/o vías de señalización relacionadas con dicho gen, a través de un análisis global de transcriptoma. A partir de ello se discuten los procesos biológicos y/o vías de señalización en las que potencialmente se encuentra involucrado el producto proteico de dicho gen, del cual se desconoce su función.

Como antecedentes para prever cambios en la expresión génica global a través de la inhibición de *PRR12* en el presente modelo, la proteína codificada por dicho gen posee dominios y residuos relacionados con la formación de complejos proteicos y remodelación de la cromatina. Además, al menos una isoforma fue encontrada en el núcleo de células neuronales de rata, lo que refuerza la noción de un papel como cofactor en la regulación de la transcripción génica a través de su unión al ADN y otras proteínas. Puesto que se encontró otra isoforma de *PRR12* más pequeña incluso en la densidad post-

sináptica (PSD), *PRR12* podría tener también un rol en la comunicación neuronal (Córdova et al., 2015). En concordancia, esta isoforma más pequeña (número de acceso: BC058674), fue reportada en cerebro total de ratón en un abordaje para detectar ARNm con secuencias que codifican para péptidos señal que conducen a sus productos proteicos hacia la membrana celular, durante el desarrollo de cerebro (Jensen et al., 2004).

Los datos reportados sobre la proteína PRR12 (Uniprot, 2015), sugieren múltiples sitios de fosforilación en residuos de serina, los cuales se sabe que son modificaciones post-traduccionales que influyen y controlan la actividad enzimática, conformación proteica, interacciones proteína-proteína y localización celular (Olsen et al., 2006), jugando un rol en múltiples aspectos de la vida celular, y funcionando como parte importante del proceso de señalización intracelular (Johnson, 2009).

La unión de la proteína PRR12 con el ADN puede justificarse ya que dicha proteína posee además 2 dominios A.T. hook, los cuales aparentemente tienen actividades de unión al ADN y facilitan cambios en su estructura, ya sea por parte de una sola proteína o como parte de un complejo proteico (Aravind et al., 1998). Un ejemplo de factores de la transcripción con dominios A.T. hook es MECP2 (Proteína de unión a metil-CpG 2 (Síndrome de Rett)) perteneciente a una familia de proteínas nucleares con dominios de unión a metil-CpG en el ADN para regular la expresión génica (UCSC, 2009).

Además, *PRR12* posee un residuo de lisina prono a acetilación, la cual es otra modificación post-traducciona, reversible, que se encuentra ligada a metabolismo y señalización celular, involucrándose en múltiples procesos biológicos a través de la regulación de interacciones, actividad y localización de la proteína (Chunaram et al., 2014).

Las regiones ricas en prolina parecen ser críticas en el ensamblaje de grandes complejos proteicos de señalización, encontrándose usualmente involucrados en crecimiento celular, rearrreglos citoesqueléticos, transcripción, señalización post-sináptica, y otros procesos celulares clave, a través de la unión a dominios SH3, WW, EVH1, así como a otros dominios ricos en prolina (Williamson, 1994; Zarrinpar et al, 2003).

En conjunto, estos aspectos y los analizados por nuestro grupo de trabajo (Córdova et al., 2015) y la presente tesis, sugieren fuertemente que la proteína *PRR12*, tiene un papel importante en vías de señalización de procesos neuronales tempranos y probablemente en comunicación célula-célula, interactuando con múltiples proteínas y/o regulando otros genes cómo un factor de transcripción de remodelación de la cromatina. Todo esto concuerda con los perfiles temporales-espaciales de expresión normal de *PRR12* y con el gran número de genes, procesos biológicos y vías de señalización que se encontraron afectados tras su inhibición en el presente estudio, los cuales se discuten a continuación.

Mediante los análisis de Western blot y qPCR se determinó que aunque *PRR12* se encuentra expresado en cerebro de ratas adultas, su expresión es mucho mayor en las etapas tempranas del desarrollo (E15), lo que en primera instancia apoya la noción de un rol en el neurodesarrollo, aunque no limitado a etapas tempranas del desarrollo del SNC.

En estudios de integración de datos en ratón, se han encontrado genes candidatos como reguladores de proliferación celular durante el neurodesarrollo en ratón, como son *Celsr1*, *Tead2*, *Neurog2* y *Sox3* (Vied et al., 2014), de los cuales en nuestro microarreglo se encontraron como diferencialmente expresados *Celsr1* (sub-expresado). *Celsr1* es un receptor que se cree puede jugar un rol en la comunicación célula-célula durante la formación del sistema nervioso, mientras, *Tead2* (sub-expresado) es uno de los primeros factores de transcripción expresados en los comienzos del desarrollo en mamíferos, siendo especialmente requerido durante el desarrollo neural, donde juega un papel en el cierre del tubo neural, y aparentemente regula la expresión de *Pax3* (Kaneko et al., 2007). *Pax3* es otro gen esencial para el desarrollo cerebral, ya que es un factor de transcripción expresado en el embrión en desarrollo como un factor crítico en la adecuada formación del sistema nervioso y en otros sistemas (Epstein, 2000). *Pax3* al igual que los anteriores, se encontró sub-expresado tras la inhibición de *PRR12*.

Además de estos genes, en el análisis por microarreglo se encontraron diferencialmente expresados los siguientes genes relacionados:

CELSR3 (sobre-expresado), el cual también participa —de manera similar a *Celsr1*— en el desarrollo del sistema nervioso guiando el crecimiento de los axones junto con *FZD3* (Chai et al., 2015).

NEUROG1 (sub-expresado), de la misma familia que *NEUROG2*, es un gen pro-neural, activando la diferenciación hacia neuronas glu+, definiendo el destino celular, específicamente en neocórtex (Wilkinson et al, 2013).

Se encontraron también sub-expresados varios genes de la familia *SOX* (*SOX7*, *SOX14*, *SOX17* y *SOX21*), los cuales funcionan como una familia de factores de transcripción involucrados en la regulación del desarrollo embrionario, y en la determinación del destino celular (Rocha, 2014).

NRCAM (sub-expresado) codifica para una molécula de adhesión celular de la familia L1, ésta juega un rol en una gran variedad de procesos del sistema nervioso, como su desarrollo, incluyendo proliferación celular y diferenciación, crecimiento y guía de axones, y formación de sinapsis, además de su papel como molécula de unión entre neuronas y glía. Alteraciones en la estructura o expresión de esta proteína, se encuentran asociados con desordenes psiquiátricos, como el autismo (Demyanenko et al., 2014; Sakurai, 2012).

La línea celular de glioblastoma C6 consiste en células gliales en mayor o menor medida diferenciadas (Benda et al., 1968), por lo que éstas deben

expresar los marcadores comunes para células gliales; sin embargo ante la inhibición de *PRR12*, se encontraron un gran número de marcadores gliales disminuidos (Tabla 12).

Tabla 12. Marcadores gliales diferencialmente expresados.

GEN	EXPRESIÓN
<i>CAR2</i>	sub-expresado
<i>CLDN11</i>	sub-expresado
<i>FABP6</i>	sub-expresado
<i>GFAP</i>	sub-expresado
<i>LINGO1</i>	sub-expresado
<i>LINGO3</i>	sub-expresado
<i>LRRN1</i>	sub-expresado
<i>MBP</i>	sub-expresado
<i>MOG</i>	sub-expresado
<i>NFASC</i>	sub-expresado
<i>OLIG2</i>	sub-expresado
<i>OLIG3</i>	sub-expresado
<i>S100B</i>	sub-expresado
<i>SLC22A1</i>	sub-expresado
<i>SPARCL1</i>	sub-expresado

Esto podría indicar que estas células entraron en un proceso de cambio de diferenciación, pudiendo comenzar a diferenciarse hacia fenotipos tipo neuronal o mesenquimal, así como en las etapas intermedias de diferenciación (Rieske et al., 2009; Wolańczyk et al., 2010); sin embargo, múltiples genes identificados como marcadores neuronales, también se encontraron sub-expresados (Tabla 13).

A decir verdad, a pesar de encontrar múltiples cambios en la expresión de genes de diferenciación y/o de membrana o comunicación, el análisis morfológico de células en cultivo no mostró diferencias claras entre las células controles y las células transfectadas con el ARNi contra *PRR12* (Figura 25).

Tabla 13. Marcadores neuronales diferencialmente expresados.

GEN	EXPRESIÓN
<i>GAD2</i>	sub-expresado
<i>GRIN1</i>	sub-expresado
<i>HOXA1</i>	sub-expresado
<i>NELL2</i>	sub-expresado
<i>NEUROD7</i>	sub-expresado
<i>LPPR4</i>	sub-expresado
<i>ROBO3</i>	sub-expresado
<i>SYP</i>	sub-expresado
<i>SNCA</i>	sub-expresado
<i>VAMP2</i>	sub-expresado

Es posible que estas células estén comenzando a cambiar hacia un fenotipo mesenquimal, debido a la sobreexpresión de marcadores de este tipo, como son la 5'-nucleotidasa y V-CAM1, así como a la disminución de CD34.

Debido a posiblemente a la heterogeneidad de la línea celular C6, ya sea por su naturaleza tumoral, o al hecho de que esta puede diferenciarse a múltiples tipos celulares, y a que se encuentran tanto células diferenciadas como sin diferenciar (Benda et al., 1968). Es probable que los datos encontrados en el microarreglo correspondan a múltiples procesos diferentes realizándose al mismo tiempo esto en distintas direcciones, impidiendo evaluar un proceso

especifico, lo cual hace necesario realizar ensayos de inhibición de *PRR12* en una población homogénea de células, preferiblemente en un cultivo neuronal primario. Aunque el presente análisis puede reforzar nuestra noción de que probablemente *PRR12* si tenga una función también en el proceso de diferenciación celular (Córdova et al., 2015).

En cuanto a la comunicación celular, es muy probable que *PRR12* esté involucrado en estos procesos, especialmente durante la neurogénesis, ya que se encontraron múltiples genes desregulados que se sabe trabajan en este tipo de procesos, como receptores glutamatérgicos y gabaérgicos, en conjunto con alrededor de otros 1300 receptores acoplados a proteína G, que vieron su expresión de ARNm disminuida.

Estos receptores acoplados a proteína G (GPCR por sus siglas en inglés) son el más grande y diverso grupo de receptores de membrana en eucariotas, estos actúan recibiendo mensajes de diferentes tipos de moléculas (péptidos, lípidos, azúcares y proteínas) e informando a la célula acerca de la presencia o ausencia de nutrientes o factores del microambiente (Nature, 2015). La inhibición de un gran número de estos receptores puede impedir la recepción de estímulos celulares, lo cual a su vez inhibe otros procesos, como la replicación celular (Jones et al., 2014), lo cual podría también explicar los numerosos genes sub-expresados.

La inhibición de múltiples vías de señalización de receptores acoplados a proteína G, concuerda altamente con los resultados derivados del estudio de transcriptoma de la línea celular linfoblastoide derivada de la paciente con alteraciones neuropsiquiátricas y DI descrita por Córdova y colaboradores en 2015, en la cual se encontró una translocación equilibrada que interrumpió a *PRR12*. Dentro de estos resultados se encontraron favorecidas las vías de receptores tipo rodopsina, monoamínicos y “otros receptores” acoplados a proteína G (Córdova-Fletes et al., 2015) (WikiPathways). Además de esto, aproximadamente 100 genes diferencialmente expresados en la línea celular de dicha paciente, se encontraron diferencialmente expresados en la línea celular C6 con inhibición de *PRR12*. En particular, llaman la atención los genes *CELSR1*, *CPEB1*, *DISC1*, *NRCAM*, *PTPRJ*, *PTPRO*, cuyas funciones incluyen adhesión celular/neuronal, crecimiento, proliferación y diferenciación celular, dirección del cono axonal y dirección de neuritas.

Estos resultados son prometedores para reforzar nuestra percepción de *PRR12* como un gen que participa en procesos de comunicación, proliferación y/o diferenciación celular durante el neurodesarrollo.

Es posible también que las diferentes isoformas de *PRR12*, estén encargadas de diferentes procesos, tras lo cual, la inhibición de todas ellas, se produce un efecto aditivo en el número de genes afectados, así mismo es muy probable que una gran cantidad de los genes que se encontraron afectados tras la

inhibición de *PRR12* no se encuentren directamente siendo regulados por su proteína, sino que son genes regulados por otros diversos factores de transcripción, que a su vez sí se ven afectados por la inhibición de *PRR12*. Esto debido a que se determinó que tras la inhibición de *PRR12*, se vieron afectadas múltiples proteínas conocidas por sus características comprobadas como factores de transcripción, como son: *TEAD2*, *ASCL4*, *ASCL2*, *GATA1*, *GATA4*, y múltiples genes de la familias *SOX* y *PAX*.

A pesar de que con una inhibición de entre el 40 y 60% mediante ARNi nosotros observamos una gran cantidad de genes diferencialmente expresados en la línea celular C6, aún se desconoce si la ausencia de una sola copia, es decir, una sub-expresión al 50%, sea capaz de conducir a tales cambios en organismos en desarrollo (e.g. humanos o roedores); o que a través de otros mecanismos compensatorios como la sobre expresión de la copia restante, *PRR12* sea un gen haplosuficiente durante el neurodesarrollo permitiendo al organismo desarrollarse sin alteraciones evidentes como para ser diagnosticadas. Esta última hipótesis, se debe a la ausencia de individuos reportados –a excepción del paciente reportado por Córdova y colaboradores en 2015– con mutaciones específicas de pérdida de función de *PRR12* que conduzcan a un fenotipo anormal. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en realidad, el mecanismo molecular patogénico a partir de *PRR12* se deba a una combinación de defectos (e.g. ganancia de función + pérdida de la función original (Córdova et al., 2015)).

Es de importancia también señalar que recientemente otras proteínas de la familia de proteínas ricas en prolina (PRR) se encuentran relacionadas con comunicación neuronal, como lo es el caso de *PRR7*, la cual fue encontrada interaccionando con PSD-95 y el receptor NMDA, formando parte de los componentes de la PSD, y con un posible rol en la formación de sinapsis (Murata et al., 2005). Asimismo, *PRR5* es una subunidad del complejo 2 del blanco de rapamicina en mamíferos (mTORC2). En el cerebro, mTOR es importante para el desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica y la regeneración axonal, así como para la limitación de formaciones de cicatrices astrocíticas (Weber et al., 2012). *PRR5* fue recientemente asociado a desorden bipolar (Winham et al., 2012). Sin embargo, ninguno de estos dos genes fue encontrado diferencialmente expresado en el modelo de la presente tesis.

PRRC2B con función también desconocida, se ha encontrado en plasma y neuritas de grandes neuronas, detectando una mayor expresión principalmente durante etapas tempranas del desarrollo (E18), posiblemente asociando esta proteína al desarrollo de neuritas (Mei et al., 2013).

Finalmente y en concordancia con nuestra hipótesis y observaciones, el ARNm de *PRR12* fue previamente identificado como blanco de la proteína de retraso mental de X frágil (FMRP, por sus siglas en inglés), una proteína que se cree está relacionada a la regulación traduccional de muchas proteínas probablemente involucradas en plasticidad sináptica (Darnell et al., 2011).

En resumen, nosotros presentamos el primer modelo knockdown de *PRR12* en células nerviosas, así como el análisis integral de su potencial función y el panorama transcripcional tras la alteración de la expresión de dicho gen. Aunque nosotros comparamos la expresión de la línea celular C6 contra sí misma pero con y sin tratamiento de inhibición (es decir, se eliminó cualquier sesgo de “background” genético), la gran cantidad de genes diferencialmente expresados en la línea celular C6 con la inhibición de *PRR12* es intrigante. Sin embargo, el hecho de que una porción de genes (al menos 100) diferencialmente expresados en la línea celular C6 con inhibición de *PRR12* también estuvieron diferencialmente expresados en la paciente descrita por nuestro grupo de trabajo, nos permite inferir ciertos procesos biológicos en los que participa *PRR12*. Esto nos estimula a realizar nuevos ensayos de expresión génica para validar nuestros hallazgos y dibujar el primer esquema de señalización a partir de la función de *PRR12* en el SNC y/u otros escenarios celulares. Asimismo, nos permite inferir potenciales escenarios en los que podría participar *PRR12* –o incluso genes dentro de su vía–, en el desarrollo de enfermedades neurológicas, incluyendo DI.

Capítulo X

CONCLUSIONES

- Se lograron describir genes potencialmente regulados por *PRR12*, así como diferentes procesos biológicos y vías de señalización que se pueden ver afectadas tras su inhibición.
- Debido a las características predichas de la proteína PRR12 y a los datos obtenidos, es muy posible que *PRR12* actúe como un factor de transcripción, funcionando principalmente como activador transcripcional de genes asociados a procesos de comunicación celular.
- Los datos obtenidos parecen apuntar hacia PRR12 como un componente de las vías de señalización de diversos receptores asociados a proteínas G, además de demostrar una asociación con la membrana celular, participando así en la recepción y transducción de un gran número de señales en el sistema nervioso, involucrándose en múltiples procesos de comunicación celular, como la transmisión sináptica y la percepción de estímulos por parte de receptores de membrana, encontrándose en los comienzos de una cascada de señalización de segundos mensajeros que implica un gran número de genes río abajo de ésta vía de señalización.

- Debido a su alta expresión en cerebro durante la etapa embrionaria y su disminución en etapas posteriores, es posible que *PRR12* ejerza un papel importante en el proceso del neurodesarrollo, indicando que está involucrado en el desarrollo del SNC, pero también cumple funciones de mantenimiento del mismo posterior al desarrollo.

Capítulo XI

PERSPECTIVAS

- Validar algunos de los genes obtenidos como desregulados en el microarreglo, mediante qPCR.
- Realizar un mayor silenciamiento del ARNm de *PRR12*, con posterior análisis por microarreglo de expresión.
- Realizar un silenciamiento de *PRR12* en cultivo celular primario de cerebro, para eliminar el tras-fondo genetico de las células cancerígenas.
- Realizar la sobre-expresión de *PRR12* en cultivo celular para comprobar los resultados obtenidos.
- Realizar experimentos de diferenciación celular con células inhibidas y sin inhibir, para determinar si *PRR12*, está involucrado en diferenciación celular.

Capítulo XII

REFERENCIAS

- Alsina, R. N., Quillet, P. R., & Carulla, L. S. (2004). *Salud mental y alteraciones de la conducta en las personas con discapacidad intelectual. Guía práctica para técnicos y cuidadores* (3rd ed.). Madrid: FEAPS.
- Aravind, L., & Landsman, D. (1998). AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, 26(19), 4413–4421. <http://doi.org/10.1093/nar/26.19.4413>
- Ashburner. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*, 25(1), 25–9.
- Backx, L., Seuntjens, E., Devriendt, K., Vermeesch, J., & Esch, H. Van. (2011). A Balanced Translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) Leading to Reciprocal Fusion Transcripts in a Patient with Intellectual Disability and Agenesis of Corpus Callosum. *Cytogenet Genome Res*, 132(3), 135–143. <http://doi.org/10.1159/000321577>
- Backx, L., Seuntjens, E., Devriendt, K., Vermeesch, J., & Van Esch, H. (2011). A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum. *Cytogenetic and Genome Research*, 132(3), 135–143. <http://doi.org/10.1159/000321577>
- Bai, H. (2012). *Genome-Wide RNAi Screen for the Discovery of Gene Function, Novel Therapeutical Targets and Agricultural Applications*. <http://doi.org/10.5772/49945>
- Baker, S. A., Chen, L., Wilkins, A. D., Yu, P., Lichtarge, O., & Zoghbi, H. Y. (2013). clinical course of Rett syndrome and related disorders. *Cell*, 152(5), 984–996. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.038.A>
- Bar-shira, O., & Chechik, G. (2013). Predicting protein-protein interactions in the post synaptic density. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 56, 128–139. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.004>
- Bayés, À., Collins, M. O., Croning, M. D. R., van de Lagemaat, L. N., Choudhary, J. S., & Grant, S. G. N. (2012). Comparative Study of Human

- and Mouse Postsynaptic Proteomes Finds High Compositional Conservation and Abundance Differences for Key Synaptic Proteins. *PLoS ONE*, 7(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046683>
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., & Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Nature*, 161.
- Bromberg, K. D., Iyengar, R., & He, J. C. (2008). Regulation of neurite outgrowth by G(i/o) signaling pathways. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13, 4544–4557. <http://doi.org/10.2741/3022>
- Bugge, M., Bruun-Petersen, G., Brøndum-Nielsen, K., Friedrich, U., Hansen, J., Jensen, G., ... Tommerup, N. (2000). Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. *Journal of Medical Genetics*, 37(11), 858–865. <http://doi.org/10.1136/jmg.37.11.858>
- Chai, G., Goffinet, A. M., & Tissir, F. (2015). Celsr3 and Fzd3 in axon guidance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 64, 11–14. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.03.013>
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnäd, F., Nielsen, M., Rehman, M., Walther, T., ... Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 325(5942), 834–40. <http://doi.org/10.1126/science.1175371>
- Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E., & Mann, M. (2014). The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 536–550. <http://doi.org/10.1038/nrm3841>
- Córdova-Fletes, C., Domínguez, M. G., Delint-Ramírez, I., Martínez-Rodríguez, H. G., Rivas-Estilla, A. M., Barros-Núñez, P., ... Neira, V. A. (2015). A de novo t(10;19)(q22.3;q13.33) leads to ZMIZ1/PRR12 reciprocal fusion transcripts in a girl with intellectual disability and neuropsychiatric alterations. *Neurogenetics*.
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y. S., Mele, A., Fraser, C. E., ... Darnell, R. B. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, 146(2), 247–261. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.013>
- De la Rocha, A. M. A., Sampron, N., Alonso, M. M., & Matheu, A. (2014). Role of SOX family of transcription factors in central nervous system tumors.

American Journal of Cancer Research, 4(4), 312–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4106650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Demyanenko, G. P., Mohan, V., Zhang, X., Brennaman, L. H., Dharbal, K. E. S., Tran, T. S., ... Maness, P. F. (2014). Neural Cell Adhesion Molecule NrCAM Regulates Semaphorin 3F-Induced Dendritic Spine Remodeling. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(34), 11274–87. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1774-14.2014>

Dimou, L., & Götz, M. (2014). Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain. *Physiological Reviews*, 94(3), 709–737. <http://doi.org/10.1152/physrev.00036.2013>

Ensembl. (2015). PRR12. Retrieved June 14, 2015, from http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000126464;r=19:49591643-49626439

Epstein, J. A. (2000). *Developmental Biology Protocols*. Humana Press. <http://doi.org/10.1385/1-59259-066-7:459>

Gécz, J., Barnett, S., Liu, J., Hollway, G., Donnelly, A., Eyre, H., ... Mulley, J. C. (1999). Characterization of the Human Glutamate Receptor Subunit 3 Gene (GRIA3), a Candidate for Bipolar Disorder and Nonspecific X-Linked Mental Retardation. *Genomics*, 62(3), 356–368.

González Rabelino, G., Raggio, V., Boidi, M., Tapié, A., & Roche, L. (2013). Avances en la identificación etiológica del retraso mental. *Revista de Neurología*, 57(SUPPL.1), 75–83.

Han, G., Sun, J., Wang, J., Bai, Z., Song, F., & Lei, H. (2014). Genomics in Neurological Disorders. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. <http://doi.org/10.1016/j.gpb.2014.07.002>

Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T., & Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), 4557–4565.

HPA. (n.d.). ZMIZ1. Retrieved June 14, 2015, from <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000108175-ZMIZ1/tissue>

HPA. (2015). Tissue expression of PRR12. Retrieved June 14, 2015, from <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000126464-PRR12/tissue>

- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., ... Zimmermann, P. (2008). Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes.
- Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, a R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., ... Friend, S. H. (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*, 102(1), 109–126. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00015-5](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00015-5)
- Jensen, P., Magdaleno, S., Lehman, K. M., Rice, D. S., LaVallie, E. R., Collins-Racie, L., ... Curran, T. (2004). A neurogenomics approach to gene expression analysis in the developing brain. *Molecular Brain Research*, 132(2), 116–127. <http://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.10.002>
- Jones, S., & Rappoport, J. Z. (2014). Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 51, 23–28. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.014>
- Kaneko, K. J., Kohn, M. J., Liu, C., & DePamphilis, M. L. (2007). Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure. *Genesis*, 45(9), 577–587. <http://doi.org/10.1002/dvg.20330>
- Kaneshiro, N. K. (2013). Discapacidad intelectual. Retrieved June 14, 2015, from <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001523.htm>
- Kunde, S. A., Rademacher, N., Tzschach, A., Wiedersberg, E., Ullmann, R., Kalscheuer, V. M., & Shoichet, S. a. (2013). Characterisation of de novo MAPK10/JNK3 truncation mutations associated with cognitive disorders in two unrelated patients. *Human Genetics*, 132(4), 461–471. <http://doi.org/10.1007/s00439-012-1260-5>
- Land, K. M. (2000). After expression profiling: the pathway to functional discovery. *Trends in Microbiology*, 8(9), 394–395. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01835-7](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01835-7)
- Laumonnier, F., Cuthbert, P. C., & Grant, S. G. N. (2007). The role of neuronal complexes in human X-linked brain diseases. *American Journal of Human Genetics*, 80(2), 205–220. <http://doi.org/10.1086/511441>
- Laumonnier, F., Roger, S., Guérin, P., Molinari, F., M'Rad, R., Cahard, D., ... Briault, S. (2006). Association of a functional deficit of the BKCa channel, a synaptic regulator of neuronal excitability, with autism and mental retardation. *American Journal of Psychiatry*, 163(9), 1622–1629. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.9.1622>

- LN, J. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 37, 627–41. <http://doi.org/10.1042/BST0370627>
- MAJLUF, E., & VÁSQUEZ, F. (n.d.). *Manual de psiquiatria* (2nd ed.).
- Mei, Q., Liu, J., Liu, Y., Li, C., Wang, H., Li, H., ... Lan, X. (2013). Expression of proline-rich coiled-coil 2B protein in developing rat brains. *Neuroscience Letters*, 557(PB), 171–176. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.10.041>
- Moreno, A. T. i. (2009). Sistema nervioso. Retrieved June 13, 2015, from https://www.infermeravirtual.com/esp/el_proyecto/fitxa/como_citar
- MSPSI. (2012). *Clasificacion internacional de enfermedades* (9th ed.).
- Murata, Y., Doi, T., Taniguchi, H., & Fujiyoshi, Y. (2005). Proteomic analysis revealed a novel synaptic proline-rich membrane protein (PRR7) associated with PSD-95 and NMDA receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(1), 183–191. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.154>
- Nagase, T., Ishikawa, K., Nakajima, D., Ohira, M., & Seki, N. (1997). Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes . VII . The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Can Code for Large Proteins in vitro, 150, 141–150.
- Nature concept. (n.d.). Retrieved June 28, 2015, from <http://www.nature.com/scitable/topicpage/gpcr-14047471>
- NCBI. (2010). ZMIZ1. Retrieved June 14, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57178>
- NCBI. (2015a). HomoloGene PRR12. Retrieved June 14, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/18957>
- NCBI. (2015b). PRR12. Retrieved June 14, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57479>
- NICHHD. (2014). What are the parts of the nervous system? Retrieved June 13, 2015, from <http://www.nichd.nih.gov/health/topics/neuro/conditioninfo/Pages/parts.aspx>
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., & Mann, M. (2006). Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation

- Dynamics in Signaling Networks. *Cell*, 127(3), 635–648.
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>
- Paridaen, J. T., & Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Reports*, 15(4), 351–364.
<http://doi.org/10.1002/embr.201438447>
- Patel, S. (2013). Fenilcetonuria. Retrieved June 14, 2015, from
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001166.htm>
- Rieske, P., Golanska, E., Zakrzewska, M., Piaskowski, S., Hulas-Bigoszewska, K., Wolańczyk, M., ... Liberski, P. P. (2009). Arrested neural and advanced mesenchymal differentiation of glioblastoma cells-comparative study with neural progenitors. *BMC Cancer*, 9, 54. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-9-54>
- Robert I, S., Ruth a, L., Karrie a, S., Sharon Borthwick-Duffy, Val Bradley, W. H., E, B., ... Traducido. (2007). El nuevo concepto del retraso mental : Comprendiendo El Carnbio Al Termino Discapacidad Intelectual. *Revista Española Sobre Discapacidad Intelectual*, 38(4), 5–20.
- Ropers, H.-H. (2007). New perspectives for the elucidation of genetic disorders. *American Journal of Human Genetics*, 81(2), 199–207.
<http://doi.org/10.1086/520679>
- Sakurai, T. (2012). The role of NrCAM in neural development and disorders-Beyond a simple glue in the brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 49(3), 351–363. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.12.002>
- Schalock, R. L., Borthwick-Duffy, S., Bradley, V. J., Buntinx, W. H. E., Coulter, D. L., Craig, E. M., ... Yeager, M. H. (2010). *Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports* (11th Editi). Washington: AAIDD.
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2012). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 29(6), 997–1003.
<http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- SfN. (n.d.). Retrieved June 13, 2015, from <http://www.sfn.org/about/about-neuroscience?pagename=whatIsNeuroscience>

- Shawky, R. M., El-Baz, F., Elsobky, E. S., Elsayed, S. M., Zaky, E., & El-Hossiny, R. M. (2011). Screening for subtle chromosomal rearrangements in an Egyptian sample of children with unexplained mental retardation. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 12(1), 63–68. <http://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2011.02.014>
- Shoichet, S. a., Duprez, L., Hagens, O., Waetzig, V., Menzel, C., Herdegen, T., ... Kalscheuer, V. M. (2006). Truncation of the CNS-expressed JNK3 in a patient with a severe developmental epileptic encephalopathy. *Human Genetics*, 118(5), 559–567. <http://doi.org/10.1007/s00439-005-0084-y>
- Tebbenkamp, A. T. N., Willsey, A. J., State, M. W., & Šestan, N. (2012). The Developmental Transcriptome of the Human Brain: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Curr Opin Neurol.*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- TSR. (n.d.). Retrieved June 17, 2015, from <http://www.ratas.com.ar/?id=2&titulo=ciclo-de-vida-de-las-ratas>
- Tsurusaki, Y., Okamoto, N., Ohashi, H., Kosho, T., Imai, Y., Miyatake, S., & Matsumoto, N. (2012). Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *NATURE GENETICS*, 44, 376–378. <http://doi.org/10.1038/ng.2219>
- UCSC. (2009). Retrieved July 1, 2015, from http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg_gene=uc004fjv.2&hgg_prot=P51608&hgg_chrom=chrX&hgg_start=153287263&hgg_end=153363188&hgg_type=knownGene&db=hg19&hgslid=433625575_8k2d4CAAH3z13WYFMA0cLnU1eS8j
- Uniprot. (2015). PRR12. Retrieved June 14, 2015, from <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9ULL5>
- Urbain, N., & Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(November), 1–19. <http://doi.org/10.3389/fncel.2014.00396>
- Utami, K. H., Winata, C. L., Hillmer, A. M., Aksoy, I., Long, H. T., Liany, H., ... Cacheux, V. (2014). Impaired Development Of Neural-Crest Cell Derived Organs and Intellectual Disability Caused By MED13L Haploinsufficiency. *Human Mutation*, 1–36. <http://doi.org/10.1002/humu.22636>
- Vandeweyer, G., & Kooy, R. F. (2009). Balanced translocations in mental retardation. *Human Genetics*, 126(1), 133–147. <http://doi.org/10.1007/s00439-009-0661-6>

- Vázquez-Ortiz, G., Piña-Sánchez, P., & Salcedo, M. (2006). Grandes alcances de los RNAs pequeños RNA de interferencia y microRNA. *Revista de Investigacion Clinica*, 58(4), 335–349.
- Vied, C. M., Freudenberg, F., Wang, Y., Raposo, A. a. S. F., Feng, D., & Nowakowski, R. S. (2014). A multi-resource data integration approach: Identification of candidate genes regulating cell proliferation during neocortical development. *Neurogenomics*, 8(August), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fnins.2014.00257>
- Weber, J. D., & Gutmann, D. H. (2012). Deconvoluting mTOR biology. *Cell Cycle*, 11(2), 236–248. <http://doi.org/10.4161/cc.11.2.19022>
- Wilkinson, G., Dennis, D., & Schuurmans, C. (2013). Proneural genes in neocortical development. *Neuroscience*, 253, 256–273. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.029>
- Williamson, M. P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical Journal*, 297(Pt 2), 249–260. <http://doi.org/061/7>
- Winham, S. J., Cuellar-Barboza, A. B., McElroyd, S. L., Oliveros, A., Crowg, S., Colbya, C. L., ... Biernacka, J. M. (2012). Bipolar disorder with comorbid binge eating history: A genome-wide association study implicates APOB. *J Affect Disord*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- Wolańczyk, M., Hułas-Bigoszewska, K., Witusik-Perkowska, M., Papierz, W., Jaskólski, D., Liberski, P. P., & Rieske, P. (2010). Imperfect oligodendrocytic and neuronal differentiation of glioblastoma cells. *Folia Neuropathologica*, 48(1), 27–34.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R. P., & Lim, W. a. (2003). The structure and function of proline recognition domains. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2003(179), RE8. <http://doi.org/10.1126/stke.2003.179.re8>

Capítulo XIII

ANEXOS

Anexo I. Condiciones de cultivo celular de la línea C6 de glioblastoma de rata.

Composición medio DMEM suplementado:

- Medio Advanced DMEM.
- Suero bovino fetal (10%).
- L-Glutamina (2mM).
- Penicilina/Estreptomicina (100U/mL y 100mcg/mL).
- Aminoácidos.

Procedimiento de siembra primaria:

- 1- Descongelamiento del vial con las células en baño de agua a 37°C.
- 2- Transferir el contenido del vial a un tubo de 15mL y mezclar con 10mL de medio DMEM suplementado.
- 3- Tomar 5mL de la suspensión de células y depositarlos en una caja Petri para cultivo, de 150mm.
- 4- Incubar a 37°C con una atmosfera al 5% de CO₂.

- 5- Realizar la observación diaria de la línea celular y verificar su adherencia a la placa.
- 6- Una vez adheridas realizar el cambio de medio cada aproximadamente cada 48h según la confluencia de las células.

Procedimiento de cambio de medio:

- 1- Retirar todo el medio viejo de cada placa Petri de cultivo con una pipeta y desecharlo.
- 2- Añadir 10mL de medio DMEM suplementado nuevo a cada placa.
- 3- Incubar a 37°C y 5% de CO₂ hasta confluencia mayor o igual al 80%.

Procedimiento de resiembra (Confluencia mayor o igual al 80%):

- 1- Retirar por completo el medio viejo de cada placa Petri y desecharlo.
- 2- Añadir 3mL de solución de tripsina/EDTA a cada placa Petri, homogeneizar suavemente por agitación e incubar a 37°C por 5 min.
- 3- Asegurar la resuspensión de todas las células rociando el interior de la caja Petri con la misma solución de tripsina de la placa varias veces.
- 4- Tomar la solución de tripsina con las células de cada placa y transferirla a un tubo de 15mL.
- 5- Añadir la misma cantidad de medio DMEM suplementado que la cantidad de tripsina recolectada en el tubo de 15mL, para realizar la neutralización de la tripsina.

- 6- Homogenizar perfectamente subiendo y bajando el líquido con una pipeta, al menos 15 veces.
- 7- Centrifugar a 2000xg por 5 minutos.
- 8- Desechar el sobrenadante sin resuspender el botón celular.
- 9- Resuspender el botón celular con entre 1mL y 10mL de medio DMEM suplementado y transferir 0.5mL a un nuevo tubo de 15mL, dependiendo de la cantidad de células que se deseen resembrar.
- 10-Añadir 10mL de medio DMEM suplementado al nuevo tubo de 15mL con las células y homogenizar con pipeta.
- 11-Añadir 5mL de la solución de células a cada placa Petri para cultivo.
- 12-Incubar a 37°C y 5% de CO₂.

Procedimiento de cuenta de número de células:

- 1- Homogenizar perfectamente la suspensión de células previamente tripsinizadas y neutralizadas.
- 2- Tomar 10µL de la suspensión y transferirlos a un tubo de 0.2mL
- 3- Añadir al tubo 60µL de medio DMEM suplementado, sin células.
- 4- Añadir al tubo 10µL de azul de tripano y homogenizar la mezcla subiendo y bajando el líquido con micropipeta al menos 20 veces.
- 5- Tomar 10µL de la mezcla y depositarlo en una cámara de Neubauer con cubre hematímetro por capilaridad.
- 6- Contar en los 4 cuadrantes de glóbulos blancos y obtener el promedio.

7- Realizar la siguiente formula: (Promedio X 8 (dilución) X 10,000)= células/mL.

Procedimiento de congelamiento de línea celular:

- 1- Despegar las células de la placa Petri utilizando una solución de tripsina/EDTA e incubando a 37°C por 5 minutos.
- 2- Transferir las células resuspendidas a un tubo de 15mL.
- 3- Añadir una cantidad equivalente de medio DMEM suplementado a la cantidad de tripsina en el tubo de 15mL.
- 4- Centrifugar a 2000xg por 5min.
- 5- Descartar el sobrenadante sin resuspender el botón de células.
- 6- Resuspender el botón celular en 1.8mL de suero bovino fetal y 0.2mL de DMSO.
- 7- Añadir 1mL de la suspensión de celular a cada criovial.
- 8- Congelar las células en el criovial directamente a -80°C, o congelarlas a -20°C por 24h y después pasarlas a un contenedor de nitrógeno líquido.

Anexo II. Lipotransfección reversa. Cultivo en placa de 24 pozos, a concentración final 5nM de ARNi Silencer Select.

- Tripsinización de las células adherentes y dilución en medio de cultivo.
 - 1- Una hora o menos antes de la transfección, tripsinizar células adherentes, saludables y en crecimiento, usando el procedimiento de rutina.
 - 2- Inactivar la tripsina resuspendiendo las células en el medio de cultivo suplementado y lavado de las mismas.
 - 3- Mantener las células resuspendidas a 37°C mientras se prepara la transfección (no dejar pasar más de 2 horas).

- Dilución del agente lipofectante siPORT NeoFX e incubación.
 - 1- Calentar el siPORT NeoFX y el medio sin suplementar (Preferentemente medio Opti-MEM I) a temperatura ambiente y centrifugar brevemente el siPORT NeoFX antes de su uso.
 - 2- Diluir el siPORT NeoFX en el medio de cultivo, (1µL de siPORT NeoFX aforado a 25µL por reacción).
 - 3- Incubar por 10min a temperatura ambiente.

- Dilución del ARNi.
 - 1- Diluir el ARNi en medio de cultivo sin suplementar (preferentemente medio Opti-MEM I) a una concentración final de 5nM; 2.5µL de ARNi 1µM, aforados a 25µL por reacción.
- Mezcla de la dilución de siPORT NeoFX y ARNi y siembra en placa.
 - 1- Combinar la dilución de siPORT NeoFX y la dilución de ARNi, mezclando por pipeteo unas cuantas veces.
 - 2- Incubar por 10min a temperatura ambiente, permitiendo la formación de los complejos ARN-liposomas.
 - 3- Dispensar la mezcla en los pozos de la placa de cultivo de 24 pozos.
- Superposición de la suspensión celular en la placa de cultivo con los complejos ARN-liposomas.
 - 1- Gentilmente mezclar las células resuspendidas y colocarlas en la placa de cultivo conteniendo los complejos de ARN-liposomas (40,000 células en un volumen de 450µL).
 - 2- Mezclar la placa con movimientos hacia delante y hacia atrás, de forma que se distribuyan los complejos y las células.
 - 3- Incubar las células transfectadas a 37°C en condiciones normales, y evaluar los efectos de la transfección entre 8 y 72h después del procedimiento.

Anexo III. Extracción de ARN mediante el RNeasy lipid tissue mini kit.

- 1- Disrumpir y homogeneizar $\leq 100\text{mg}$ de tejido graso en 1mL de buffer de lisis QIAzol.
- 2- Incubar el homogeneizado a temperatura ambiente por 5min.
- 3- Añadir 200 μL de cloroformo y agitar vigorosamente por 15s.
- 4- Incubar la muestra a temperatura ambiente por 2-3min.
- 5- Centrifugar la muestra a 12,000xg por 15min, a 4°C.
- 6- Transferir la fase superior acuosa a un tubo nuevo, evitando la interfase, añadir 1 volumen de etanol al 70% y agitar en vortex.
- 7- Transferir 700 μL de la muestra a una de las columnas propias del kit colocada en un tubo de colección de 2mL. Cerrar la tapa y centrifugar a temperatura ambiente a $\geq 8,000\text{xg}$ por 15s, descartando el flujo recolectado.
- 8- Utilizando el mismo tubo de colección, repetir el paso 7 utilizando el restante de la muestra, descartando el flujo recolectado.
- 9- Añadir 700 μL de buffer RW1 a la columna, cerrar la tapa y centrifugar a $\geq 8,000\text{xg}$ por 15s, descartando el flujo recolectado.
- 10- Añadir 500 μL de buffer RPE a la columna, cerrar la tapa y centrifugar a $\geq 8,000\text{xg}$ por 15s, descartando el flujo recolectado.
- 11- Añadir 500 μL de buffer RPE a la columna, cerrar la tapa y centrifugar a $\geq 8,000\text{xg}$ por 2min.

- 12-Para secar la membrana, colocar la columna en un nuevo tubo de colección de 2mL, cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad por 1min. Desechar el tubo de colección.
- 13-Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5mL y añadir entre 30 y 50 μ L de agua libre de nucleasas, cerrar la tapa, incubar 1min, y centrifugar $\geq 8,000\times g$ por 1min.

Anexo IV. Retrotranscripción.

1- Añadir los siguientes reactivos a un tubo estéril de 0.2mL.

- 250ng de random primers.
- 1µg de ARN total.
- 1µL de mezcla de dNTP's 10mM.
- Agua hasta 13µL.

2- Calentar la mezcla a 65°C por 5 minutos, en termociclador, e incubar en hielo por al menos 1 minuto.

3- Colectar los componentes del tubo por centrifugación y añadir los siguientes reactivos:

- 4µL de buffer 5X First-Strand.
- 1µL de DTT 0.1M.
- 1µL de RNaseOUT.
- 1µL SuperScript III.

4- Mezclar gentilmente por pipeteo e incubar a 25°C por 5min.

5- Incubar a 50°C por 60min e inactivar la reacción a 70°C por 15min.

Anexo V. Microarreglo de expresión. Dos colores, a partir de 50ng de ARN, en chip de 8 muestras.

- Preparación de los Spike A y Spike B.
 - 1- Mezclar vigorosamente los Spikes A y B en vortex.
 - 2- Calentar ambos a 37°C por 5min y agitar en vortex.
 - 3- Recolectar los componentes de los tubos mediante spin
 - 4- Realizar 4 diluciones seriadas de cada Spike (1:20, 1:40, 1:16, 1:4).

- Preparación de la reacción de marcaje.
 - 1- Añadir 50ng de ARN total de cada muestra a un tubo estéril de 0.2µL, en un volumen final de 1.5µL.
 - 2- Añadir a cada tubo 2µL de la última dilución de los Spikes (Spike A para las muestras que serán marcadas con Cy3 y Spike B para las que serán marcadas con Cy5).
 - 3- Preparar una mezcla para 20 reacciones de primer T7 de la siguiente forma:

Tabla 14. Componentes de mix T7.

<i>Componente</i>	<i>Volumen a utilizar (µL)</i>
T7 primer	16
Agua libre de nucleasas	20

- 4- Añadir 1.8µL de la mezcla de primer T7 a cada tubo.
- 5- Incubar a 65°C en termociclador, por 10min.
- 6- Incubar en hielo por 5min.
- 7- Precalentar el buffer 5x First Strand a 80°C por 3-4min.
- 8- Preparar la mezcla para ADNc de la forma correspondiente:

Tabla 15. Componentes para retrotranscripción para ADNc.

Componente	Volumen a utilizar (µL)
Buffer 5x First Strand	40
DTT 0.1M	20
Mezcla de dNTP's 10mM	10
Affinity Script RNase	24

- 9- Añadir 4.7µL de la mezcla para ADNc a cada muestra, mezclando por pipeteo.
- 10-Incubar a 40°C por 2 horas.
- 11-Incubar a 70°C por 15min.
- 12-Incubar en hielo por 5min.
- 13-Preparar 2 mezclas para transcripción, una para las muestras que serán marcadas con Cy3 y otra para las que serán marcadas con Cy5, de la siguiente forma:

Tabla 16. Componentes retrotranscripción para ARNc.

Componente	Volumen a utilizar (μL)
Agua libre de nucleasas	15
Buffer de transcripción 5x	64
DTT 0.1M	12
Mezcla de NTP's	20
T7 RNA Polymerase Blend	4.2
Cy3 o Cy5	4.8

14- Añadir 6μL de mezcla para transcripción a cada tubo, dependiendo si las muestras serán marcadas con Cy3 o Cy5, mezclando gentilmente por pipeteo.

15-Incubar las muestras a 40°C por 2h.

- Purificación del ARN amplificado y marcado.

1- Añadir 84μL de agua libre de nucleasas a cada muestra.

2- Añadir 350μL de buffer RLT y mezclar bien.

3- Añadir 250μL de etanol absoluto y mezclar por pipeteo.

4- Transferir 700μL de la muestra a una columna del kit RNeasy mini en tubo de colección, y centrifugar a 13,000rpm por 30s, a 4°C. Desechar el flujo y el tubo colector.

- 5- Transferir la columna a un nuevo tubo colector y añadir 500µL de buffer RPE a la columna. Centrifugar a 13,000rpm por 30s, a 4°C. Desechar el flujo y reutilizar el tubo colector.
- 6- Añadir otros 500µL de buffer RPE y centrifugar a 13,000rpm por 60s, a 4°C. Desechar el flujo.
- 7- Transferir la columna a un nuevo tubo colector y centrifugar a 13,000rpm por 30s, a 4°C. Descartar el flujo y el tubo de colección.
- 8- Colocar la columna en un tubo de recolección y eluir el ARNc añadiendo 30µL de agua libre de nucleasas directamente a la membrana de la columna, incubando 1min, y centrifugando a 13,000rpm por 30s, a 4°C.

- Cuantificación del ARNc.

- 1- Blanquear el Nanodrop con agua libre de nucleasas y cuantificar todas las muestras procesadas.
- 2- Determinar el rendimiento y la actividad específica mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Rendimiento } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{Concentración de ARNc}) \times 30}{1000}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{(\text{Concentración de Cy3 o 5}) \times 1000}{\text{Concentración de ARNc}}$$

3- Comparar el rendimiento y actividad específicas contra lo recomendado (Rendimiento ≥ 0.825 , Actividad específica ≥ 6), y no proceder si no se cumplen estos parámetros.

- Preparar hibridación de las muestras.

1- En 8 tubos de 0.2 μ L, añadir los siguientes reactivos, conjuntando cada muestra marcada con un colorante contra el control teñido con el colorante contrario:

Tabla 17. Mix para hibridación en el microarreglo.

<i>Componente</i>	<i>Volumen a utilizar (μL)</i>
ARNc marcado con Cy3	Equiv. 300ng
ARNc marcado con Cy5	Equiv. 300ng
Agente de bloqueo de expresión 10x	5
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 24
Buffer de fragmentación 25x	1 μ L

2- Incubar a 60°C por 30min para fragmentar el ARNc.

3- Enfriar inmediatamente en hielo por 1min.

4- Añadir 25 μ L de buffer de hibridación Hi-RPM 2x para detener la fragmentación.

5- Mezclar cuidadosamente por pipeteo, evitando la formación de burbujas.

6- Centrifugar por 1min a temperatura ambiente a 13,000rpm e hibridar 40µL en el microarreglo lo antes posible.

7- Hibridizar a 65°C por 17h, en horno rotatorio.

- Lavado del microarreglo.

1- Precalentar previamente el buffer 2 toda la noche a 37°C.

2- Sumergir el microarreglo en el buffer 1, y realizar la separación del gasket.

3- Sumergir el microarreglo en otro recipiente con buffer 1, con agitación, por 1min.

4- Sumergir el microarreglo en el recipiente con el buffer 2 precalentado, con agitación, por 1min.

5- Colocar el microarreglo en un holder y realizar el escaneo lo antes posible.

Anexo VI. Procesos biológicos afectados tras la inhibición de *PRR12*.

Tabla 18. Procesos biológicos afectados, con significancia estadística.

<i>Proceso biológico</i>	<i>Significancia</i>
receptor activity	0
signal transducer activity	0
sensory perception	0
intrinsic component of membrane	0
cellular response to stimulus	0
sensory perception of chemical stimulus	0
sensory perception of smell	0
single organism signaling	0
cell periphery	0
detection of chemical stimulus	0
single-multicellular organism process	0
response to chemical	0
system process	0
membrane part	0
detection of stimulus	0
molecular transducer activity	0
detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell	0
transmembrane signaling receptor activity	0
detection of chemical stimulus involved in sensory perception	0
detection of stimulus involved in sensory perception	0
response to stimulus	0
integral component of membrane	0
membrane	0
signaling receptor activity	0
neurological system process	0
signaling	0
G-protein coupled receptor activity	0
olfactory receptor activity	0
cell communication	0
G-protein coupled receptor signaling pathway	0
plasma membrane	0
signal transduction	0
cell surface receptor signaling pathway	0
multicellular organismal process	0
regulation of cellular process	2.07E-33
biological regulation	4.01E-32

regulation of biological process	9.84E-31
single-organism process	1.04E-26
single-organism cellular process	2.15E-25
pheromone receptor activity	2.40E-14
intrinsic component of plasma membrane	2.76E-11
integral component of plasma membrane	5.82E-10
extracellular space	2.23E-09
plasma membrane part	5.36E-09
substrate-specific channel activity	6.45E-09
molecular_function	8.60E-09
G-protein coupled peptide receptor activity	1.86E-08
passive transmembrane transporter activity	2.59E-08
channel activity	2.59E-08
peptide receptor activity	3.57E-08
ion channel activity	4.27E-08
gated channel activity	6.12E-08
serine-type peptidase activity	3.68E-07
defense response	3.80E-07
serine hydrolase activity	7.00E-07
serine-type endopeptidase activity	1.18E-06
ion channel complex	1.59E-06
voltage-gated cation channel activity	2.12E-06
hormone activity	2.29E-06
regulation of ion transport	2.51E-06
peptidase inhibitor activity	3.73E-06
transmembrane transporter complex	3.86E-06
cell-cell signaling	3.95E-06
cation channel activity	6.61E-06
transporter complex	8.17E-06
G-protein coupled amine receptor activity	8.43E-06
voltage-gated channel activity	1.69E-05
endopeptidase inhibitor activity	1.69E-05
voltage-gated ion channel activity	1.69E-05
monooxygenase activity	2.13E-05
sensory perception of taste	2.49E-05
endopeptidase regulator activity	4.53E-05
cytosolic calcium ion homeostasis	4.87E-05
external side of plasma membrane	1.46E-04
oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	1.75E-04
transmembrane transporter activity	1.91E-04

G-protein coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	2.19E-04
behavior	2.37E-04
metal ion transmembrane transporter activity	3.00E-04
voltage-gated potassium channel activity	3.40E-04
ion transmembrane transporter activity	3.57E-04
peptidase regulator activity	3.60E-04
synaptic transmission	3.95E-04
adenylate cyclase-modulating G-protein coupled receptor signaling pathway	4.17E-04
substrate-specific transmembrane transporter activity	4.84E-04
ion transmembrane transport	7.19E-04
cell surface	7.19E-04
transporter activity	7.81E-04
defense response to bacterium	8.06E-04
positive regulation of blood circulation	9.50E-04
positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	9.50E-04
ligand-gated channel activity	9.99E-04
aromatase activity	9.99E-04
ligand-gated ion channel activity	9.99E-04
positive regulation of cytokine secretion	0.00103257
regulation of synaptic transmission, GABAergic	0.00136399
neuropeptide signaling pathway	0.00143866
negative regulation of peptidase activity	0.00154107
response to bacterium	0.00160047
potassium ion transmembrane transporter activity	0.00174137
regulation of ion transmembrane transport	0.00205987
cellular potassium ion transport	0.00228121
potassium ion transmembrane transport	0.00228121
potassium channel activity	0.00229912
metal ion transport	0.00262242
regulation of transmembrane transport	0.00271158
response to lipid	0.00271158
regulation of cytokine secretion	0.00300046
digestion	0.0035895
detection of chemical stimulus involved in sensory perception of taste	0.00374149
blood circulation	0.00385152
serine-type endopeptidase inhibitor activity	0.00385152
regulation of synaptic transmission, glutamatergic	0.00396932
negative regulation of endopeptidase activity	0.00440668
trace-amine receptor activity	0.00445026
neurotransmitter receptor activity	0.00445634

circulatory system process	0.00447961
regulation of behavior	0.00508441
taste receptor activity	0.00518324
regulation of amine transport	0.00578074
regulation of blood circulation	0.00578074
regulation of secretion by cell	0.00666265
response to external stimulus	0.00706718
ion transport	0.0074513
regulation of secretion	0.00766556
transmembrane transport	0.00766556
potassium ion transport	0.00778448
postsynaptic membrane	0.00928354
cation channel complex	0.00929373
defense response to other organism	0.00938834
single-organism behavior	0.00938834
substrate-specific transporter activity	0.00946497
response to other organism	0.00954188
cellular calcium ion homeostasis	0.00976747

Anexo VII. Vías de señalización significativamente afectadas tras la inhibición de PRR12.

Tabla 19. Vías de señalización afectadas. Con significancia estadística.

<i>Vía de señalización</i>	<i>Significancia</i>
Rn_GPCRs,_Class_A_Rhodopsin-like_WP473_72158	1.33E-24
Rn_Peptide_GPCRs_WP131_71770	9.52E-10
Rn_GPCRs,_Other_WP409_71799	2.43E-08
Rn_Monoamine_GPCRs_WP276_74145	1.83E-05
Rn_Complement_and_Coagulation_Cascades_WP547_79832	2.57E-04
Rn_Tryptophan_metabolism_WP270_74148	5.52E-04
Rn_Fatty_Acid_Omega_Oxidation_WP133_71779	6.32E-04
Rn_Metapathway_biotransformation_WP1286_69345	0.0015477
Rn_Nuclear_receptors_in_lipid_metabolism_and_toxicity_WP139_79807	0.00163023
Rn_Cytokines_and_Inflammatory_Response_WP271_69453	0.00754736
Rn_Small_Ligand_GPCRs_WP161_71786	0.01083243
Rn_Complement_Activation,_Classical_Pathway_WP81_69440	0.01615314
Rn_Blood_Clotting_Cascade_WP255_71806	0.02395153
Rn_Spinal_Cord_Injury_WP2433_79923	0.03839507
Rn_Matrix_Metalloproteinases_WP278_69444	0.03847442
Rn_Ovarian_Infertility_Genes_WP263_71828	0.04952602

Anexo VIII. Esquemas de vías de señalización afectadas.

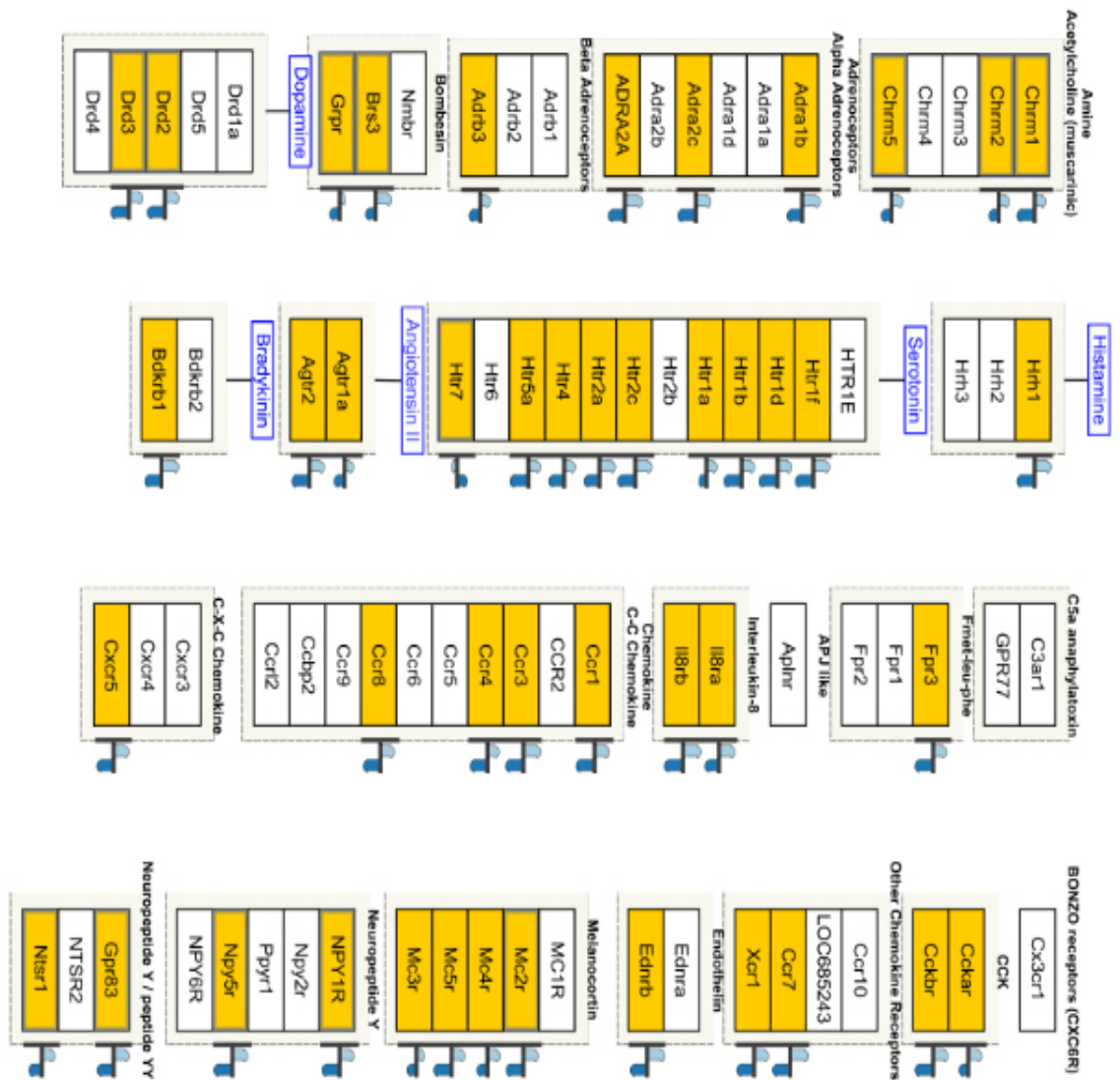


Figura 28. Receptores tipo rodopsina acoplados a proteína G (Parte 1).

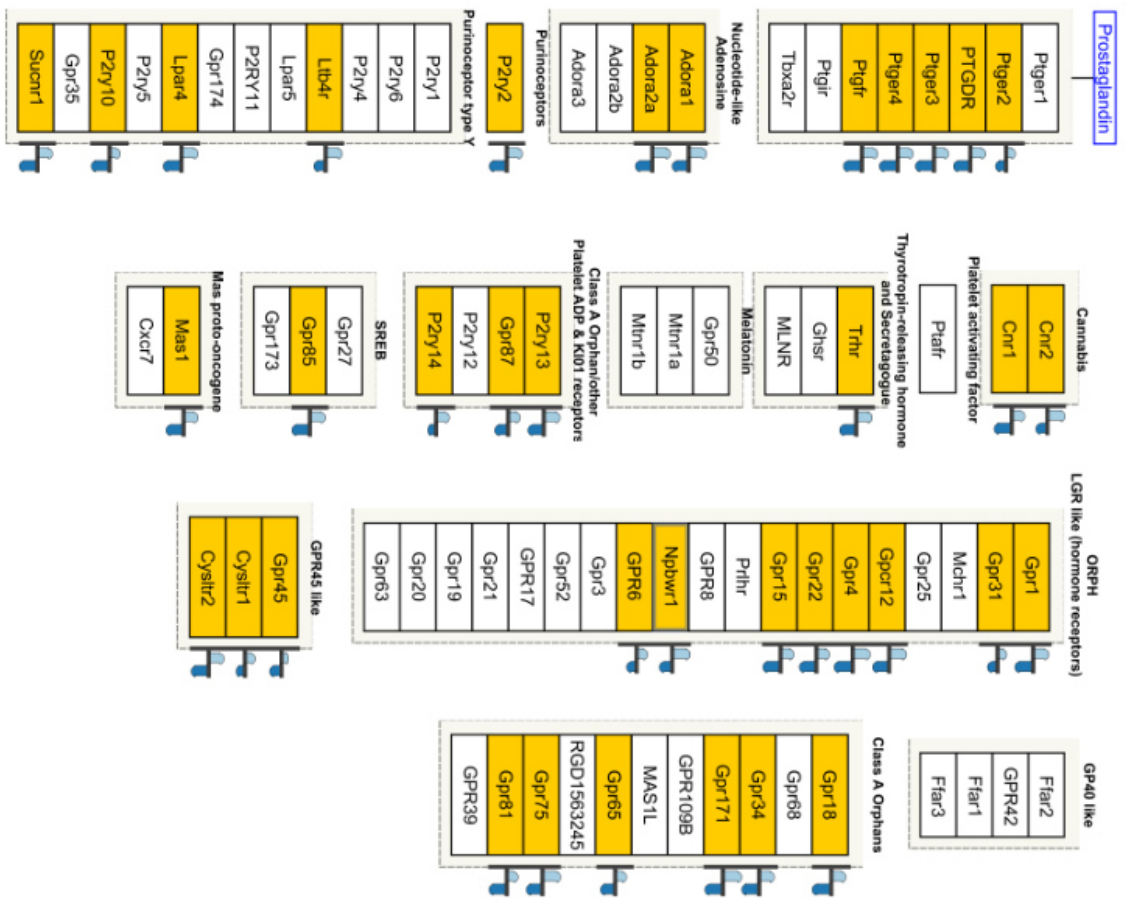


Figura 30. Receptores tipo rodopsina acoplados a proteína G (Parte 3).

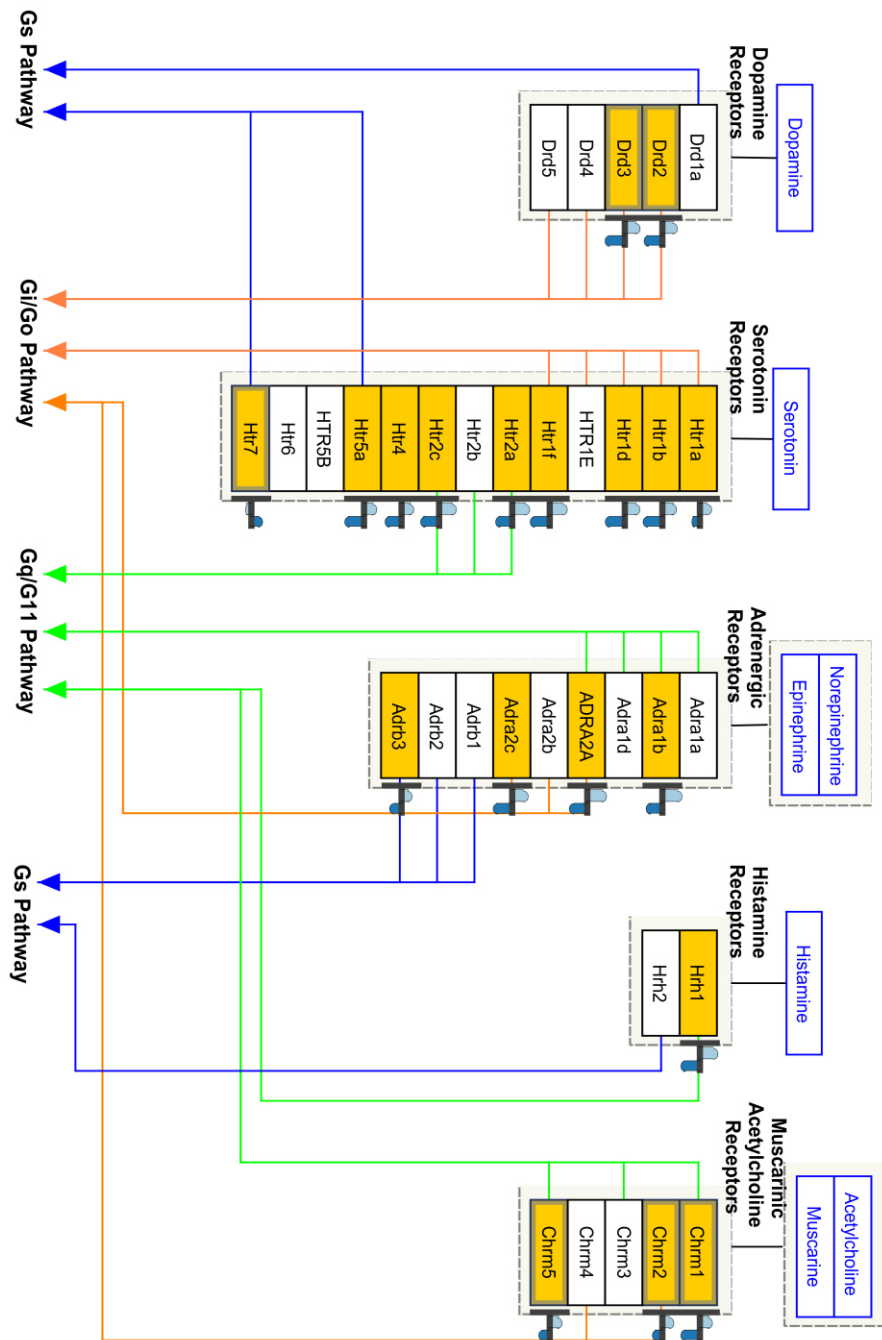


Figura 31. Receptores tipo monoamínicos acoplados a proteína G.

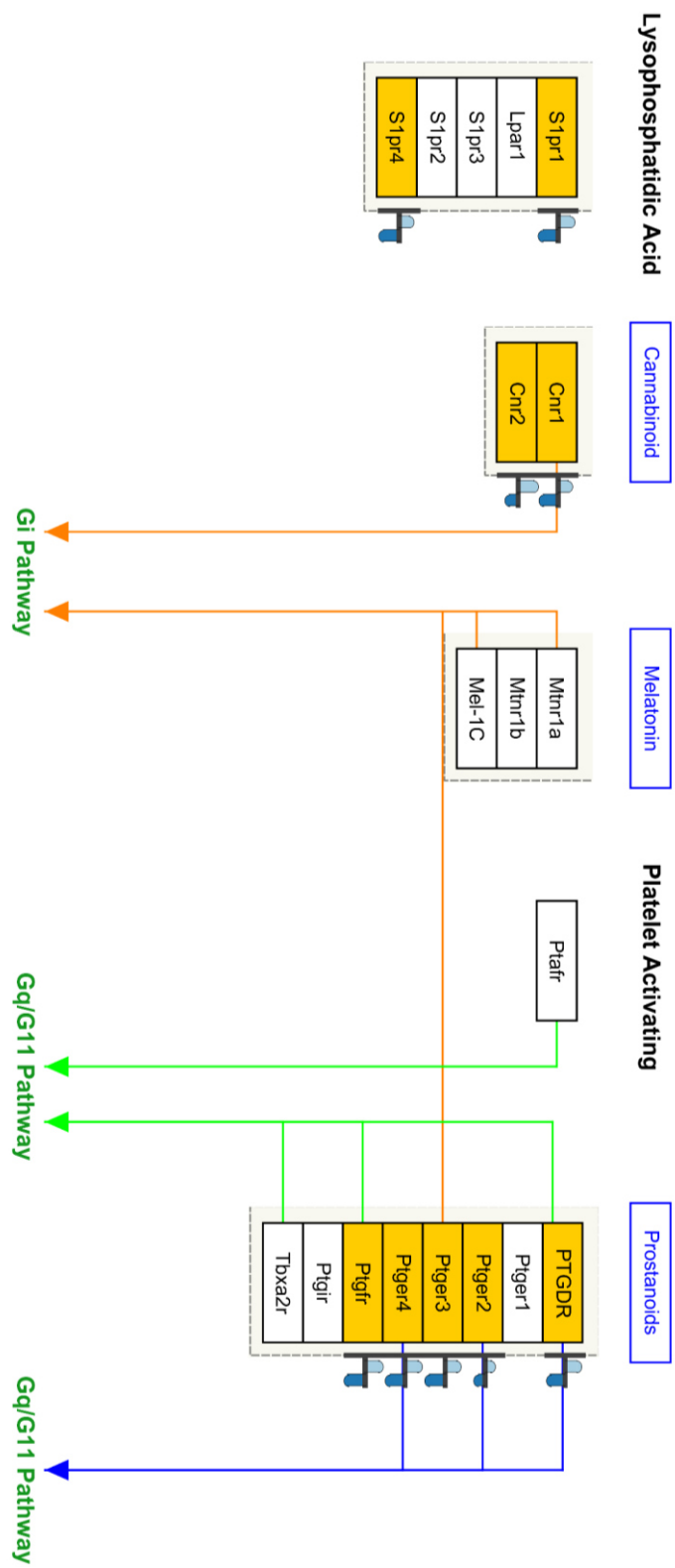


Figura 32. Receptores tipo pequeños ligandos acoplados a proteína G.

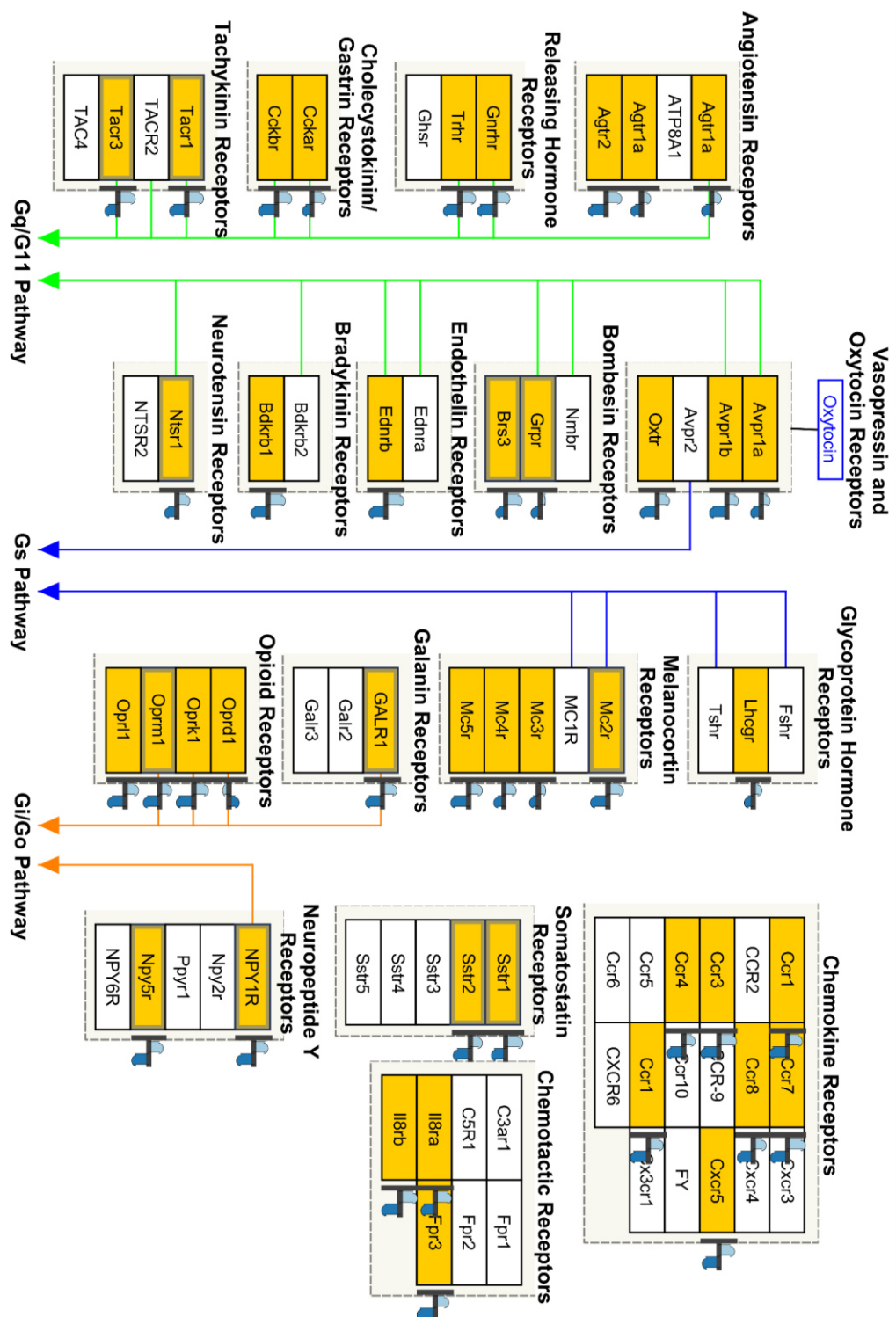


Figura 33. Receptores tipo peptídicos acoplados a proteína G.

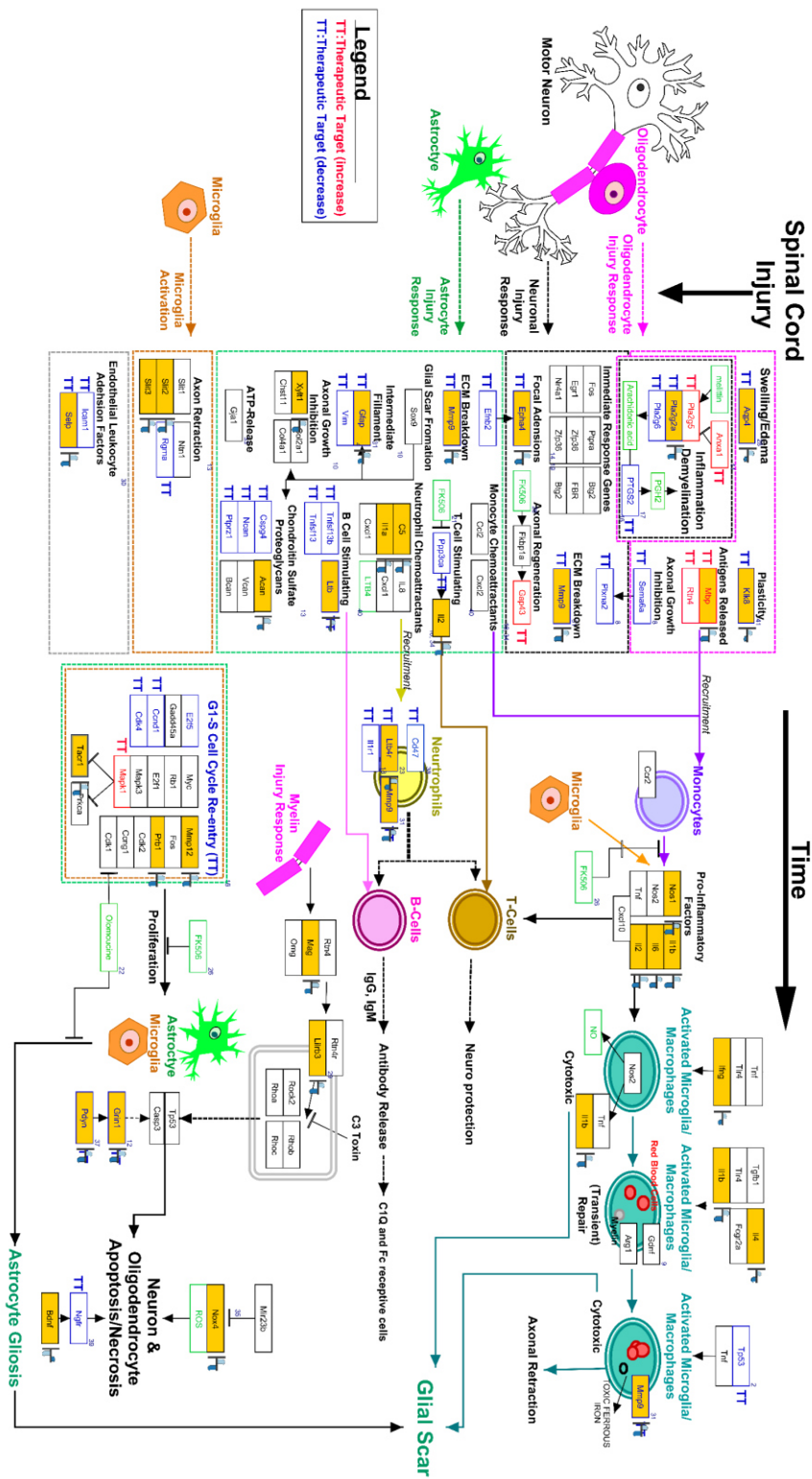


Figura 34. Vía de daño a medula espinal.